



Spectroscopie RMN cérébrale pour l'étude du milieu intracellulaire in vivo : développements méthodologiques pour la diffusion à courtes échelles de temps et pour la mesure du pH en détection 31P

Charlotte Marchadour

► To cite this version:

Charlotte Marchadour. Spectroscopie RMN cérébrale pour l'étude du milieu intracellulaire in vivo : développements méthodologiques pour la diffusion à courtes échelles de temps et pour la mesure du pH en détection 31P. Autre [cond-mat.other]. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112111 . tel-00856086

HAL Id: tel-00856086

<https://theses.hal.science/tel-00856086>

Submitted on 30 Aug 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

SPÉCIALITÉ : PHYSIQUE

Ecole Doctorale "Sciences et Technologies de l'Information
des Télécommunication et des Systèmes

Présentée par : **Charlotte MARCHADOUR**

Sujet :

**Spectroscopie RMN cérébrale pour l'étude du milieu
intracellulaire *in vivo*: développements
méthodologiques pour la diffusion à courtes échelles de
temps et pour la mesure du pH par détection ^{31}P**

Thèse soutenue le **5 juillet 2013**, devant le jury composé de :

M. Emmanuel BARBIER	Examineur
M. Ludovic DE ROCHEFORT	Examineur
M. Jean-Michel FRANCONI	Rapporteur
M. Vincent LEBON	Directeur de thèse
M. Itamar RONEN	Rapporteur
M. Julien VALETTE	Encadrant de thèse

Remerciements

La fin de ma thèse s'approche à grand pas et il est maintenant temps d'écrire cette fameuse page de remerciements qui sera certainement la page la plus lue de ce manuscrit. C'est aussi l'occasion de faire un bilan de ces trois dernières années.

Avant de commencer, comme tout futur doctorant, je redoutais cette période de ma vie qui s'annonçait tellement difficile : charge de travail importante, pression quotidienne, peu de temps pour soi... Et pourtant ! Loin des idées reçues, ces trois années sont passées très vite, sans douleur (stress mis à part) et même avec un certain plaisir.

Aujourd'hui, je laisse de côté la recherche pour revenir à mes premiers amours, l'enseignement. Pour autant je ne regrette absolument pas ces trois années qui ont été pour moi une très belle expérience professionnelle et humaine, et cela, grâce aux personnes qui m'ont entourée durant cette période.

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué à la réussite de cette thèse et particulièrement à :

- * Julien Valette pour son encadrement, son soutien quotidien et sa passion. Sans oublier tous les à-côtés qui ont rendu l'ambiance de travail si agréable : les apéros sur sa terrasse, son expertise en films potaches, les soirées de congrès et surtout surtout mon premier restaurant étoilé. Encore merci et longue vie à la spectro !
- * Vincent Lebon, malheureusement trop peu présent à MIRCen, pour son énergie et pour avoir passé son HDR juste à temps pour être officiellement mon directeur de thèse.
- * Jean-Michel Franconi, Itamar Ronen pour avoir accepté de rapporter mon travail de thèse et à Emmanuel Barbier et Ludovic de Rochefort pour leur participation à mon jury.
- * Philippe Hantraye pour m'avoir accueilli dans ce beau laboratoire pluridisciplinaire qu'est MIRCen.
- * La Team 1 : Emmanuel Brouillet, Gilles Bonvento, Carole Escartin et leurs équipes pour leur regard éclairé sur mes travaux et la convivialité de nos réunions.
- * Martine Guillermier et Diane Houitte qui m'ont permis de me dépasser et d'affronter de féroces souris dans la bonne humeur.
- * Didier Thenadey pour sa disponibilité, son efficacité et son rire communicatif.

- ★ Nadya, Romina, Yann et Julien F. pour nos apéros du vendredi soir. Merci pour votre accueil et au plaisir de se retrouver autour d'une bonne bouteille de 21 bis !

- ★ Mes collègues du bureau 110 et désormais amis : Benoit, Cécile, Chrystelle, Chloé, Coucou, Jess, Jim, Junior, Matthias, Nelly, Niels, Niet, Olène... Grâce à vous, aller au travail était (presque) toujours un plaisir. C'était tellement vrai qu'il a été difficile de vous débarrasser de moi pendant la rédaction de votre excellent "Chachou magazine". Promis je vous laisse tranquille à partir de septembre !
Un remerciement particulier à mon inséparable binôme, diffusion girl, qui en plus de me supporter toute la journée, pousse le vice jusqu'à passer ses soirées, et parfois ses vacances, avec moi.

- ★ Mes amis de PC : Pierrick, Gary, Joël, Arthur, Mathieu, Anne, Charles, Nicolas, Cécile, Laure, Steph... Toujours présents malgré nos changements de vie. Pourvu que ça dure !!

- ★ Mes colocs, Étienne (aka "le gendre idéal") et Aurélie (aka "la terreur des pigeons"), qui m'ont apportée beaucoup de réconfort, de rires et de délicieux gâteaux ces trois dernières années. Je n'aurais pas pu imaginer meilleure cohabitation. Toutes les bonnes choses ont une fin et vous allez terriblement me manquer. Je compte sur vous pour déménager dans des endroits sympas, que je vous rende visite pendant mes futures longues vacances...

- ★ Et enfin, ma petite sœur qui a inversé les rôles ces dernières années et mes parents qui ont toujours été là lors des coups durs et qui m'ont soutenue dans mon choix inattendu de reprendre mes études.

Table des matières

Abréviations et notations	1
I Introduction	5
1 Introduction	7
2 Contexte expérimental	11
3 Principes généraux	13
3.1 Principes de la RMN	13
3.1.1 Etat d'équilibre - Effet Zeeman	13
3.1.2 Description vectorielle de la RMN - Equations de Bloch	16
3.2 Impulsions radiofréquence	18
3.2.1 Paramètres d'une impulsion	19
3.2.2 Impulsions carrées	21
3.2.3 Impulsions adiabatiques d'inversion	22
II Spectroscopie de diffusion	29
4 Mécanismes de transport des molécules dans les milieux biologiques	31
4.1 Phénomène de diffusion	31
4.2 Diffusion <i>in vivo</i> et notion de diffusion anormale	33
4.2.1 Diffusion encombrée	33
4.2.2 Transports actifs	34
4.2.3 Notion de diffusion anormale	36

5	Mesure de diffusion dans les milieux biologiques	39
5.1	Techniques de mesure de la diffusion <i>in vivo</i>	39
5.2	Principe de la mesure de diffusion en RMN	40
5.2.1	Mesure de diffusion par application de gradients bipolaires	41
5.2.2	Mesure de diffusion à temps de diffusion courts	43
6	Caractérisation de la diffusion anormale dans les cellules du cerveau	49
6.1	Introduction	49
6.2	Développement d'une séquence de diffusion à très courts temps de diffusion .	51
6.2.1	Séquence LASER	51
6.2.2	Choix des gradients de diffusion	52
6.2.3	Design de la séquence finale	54
6.2.4	Optimisation des différents paramètres	55
6.3	Protocole expérimental	58
6.4	Résultats	59
6.4.1	Validation de l'utilisation d'un seul b	59
6.4.2	Expériences sur fantôme	60
6.4.3	Expériences <i>in vivo</i>	61
6.5	Modélisation des résultats	63
6.5.1	Description des modèles analytiques de diffusion encombrée	63
6.5.2	Ajustement des données	65
6.6	Discussion	67
6.6.1	Absence de preuve sur l'existence de transports actifs	67
6.6.2	Retour sur les données de la littérature	67
6.6.3	Cohérence des valeurs numériques avec la littérature	69
6.6.4	Meilleure modélisation de la diffusion intracellulaire ?	69
6.7	Conclusion	70
7	Application à un modèle de maladie neurodégénérative	71
7.1	Introduction	71
7.2	Description du projet	72
7.3	Développement d'une séquence de diffusion	72
7.3.1	Mesure de la trace du tenseur de diffusion	73
7.3.2	Amélioration 1 : Insertion de gradients de diffusion dans la séquence initiale	75
7.3.3	Amélioration 2 : Optimisation des directions des gradients de diffusion	78

7.3.4	Séquence optimisée	79
7.4	Protocole expérimental	80
7.5	Résultats	82
7.5.1	Premier temps de mesure	82
7.5.2	Deuxième temps de mesure	84
7.5.3	Troisième temps de mesure	84
7.6	Discussion	84
7.6.1	Augmentation importante de la pondération en diffusion	84
7.6.2	Optimisation généralisable à d'autres séquences de diffusion	85
7.6.3	Comparaison entre le premier et le deuxième temps de mesure	85
7.7	Conclusions et perspectives	89
III	Spectroscopie RMN du phosphore 31	91
8	Développement d'une séquence de localisation en spectroscopie ^{31}P.	93
8.1	Contraintes de la spectroscopie RMN du phosphore 31	94
8.1.1	Sensibilité du ^{31}P	94
8.1.2	Relaxation du ^{31}P	95
8.1.3	Artéfact de déplacement chimique	95
8.1.4	Contexte expérimental	96
8.2	Développement d'une séquence de localisation	96
8.2.1	Séquence de localisation ISIS	96
8.2.2	Séquence de localisation OVS	98
8.3	Détermination de la meilleure séquence de localisation	101
8.3.1	Validation de la localisation sur fantôme ^{31}P	101
8.3.2	Comparaison des spectres localisés <i>in vivo</i>	104
8.4	Mesure de pH <i>in vivo</i>	106
8.4.1	Théorie	107
8.4.2	Matériel et méthodes	108
8.4.3	Résultats	111
8.5	Conclusions et perspectives	112

IV	Conclusions et perspectives	115
9	Conclusions et perspectives	117
V	Bibliographie	119
	Bibliographie	121
VI	Annexes	133
A	Démonstration des directions optimales de gradients	135
B	Communications scientifiques	137

Abréviations et notations

^1H	Proton
^{13}C	Carbone 13
^{17}O	Oxygène 17
^{31}P	Phosphore 31
3NP	Acide 3-nitropropionique
ADC	Coefficient de diffusion apparent
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
b	Facteur de pondération en diffusion
B_0	Champ magnétique statique
B_1	Champ magnétique variable
BISTRO	B_1 insensitive train to obliterate signal
B_s	Seuil d'adiabaticité
BW	Bande passante
CEA	Commissariat à l'énergie atomique
CEST	Chemical exchange saturation transfert
CMRO ₂	Consommation d'oxygène cérébral
CPMG	Carr Purcell Meiboom Gill
Cr	Créatine
CRLB	Cramér-Rao lower bounds
δ	Déplacement chimique
D	Tenseur de diffusion
D_{free}	Coefficient de diffusion libre
DW LASER	Séquence LASER pondérée en diffusion

ESR	Electron spin resonance
F	Spectre de modulation des gradients
FCS	Fluorescence correlation spectroscopy
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
γ	Rapport gyromagnétique
G	Gradient de champ magnétique
Glu	Glutamate
HS	Impulsion adiabatique hyperbolique sécante
Ins	Inositol
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ISIS	Image Selected <i>In vivo</i> Spectroscopy
J	Constante de couplage dipolaire
k	Moment des gradients
LASER	Localization by adiabatique selective refocusing
LW	Largeur à mi-hauteur des pics
MIRCen	Molecular Imaging Research Renter
NAA	N-acétyl-aspartate
NFT	Neurofibrillary Tangles
OVS	Outer Volume Suppression
PCr	Phosphocréatine
Φ	Phase
Pi	Phosphate inorganique
ppm	Partie par million
PRESS	Point resolved spectroscopy
RF	Radiofréquence
RMN	Résonance magnétique nucléaire
R	Produit bande passante \times durée de l'impulsion
SPT	Single particle tracking
SRM	Spectroscopie par résonance magnétique
T	Tortuosité
T_1	Temps de relaxation longitudinal
T_2	Temps de relaxation transverse
Tau	Taurine
tCho	Choline totale
tCr	Créatine totale
t_{diff}	Temps de diffusion
TE	Temps d'écho
T_p	Durée de l'impulsion

TR	Temps de répétition
V_{ATP}	Vitesse de synthèse d'ATP
V_{TCA}	Vitesse du cycle de Krebs

Première partie

Introduction

Introduction

Le travail qui suit a été mené à MIRCen, un laboratoire du CEA dédié au développement de modèles animaux (rongeurs et primates) et à l'évaluation de thérapies innovantes dans le domaine des maladies neurodégénératives.

A l'heure actuelle, les processus conduisant à la mort cellulaire dans les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Huntington, Parkinson) sont encore mal connus. Néanmoins, il est établi que la neurodégénérescence est caractérisée par un déficit énergétique mais aussi par des changements morphologiques des cellules du cerveau qui apparaissent très tôt dans l'évolution de la maladie. Le développement de méthodes originales qui permettent de caractériser ces altérations est un enjeu pour la compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans ces pathologies, leur suivi au cours du temps et enfin l'évaluation de nouvelles thérapies.

Ces dernières années, l'imagerie par résonance magnétique s'est imposée comme un outil indispensable en clinique pour le diagnostic de pathologies cérébrales mais aussi en préclinique pour le suivi longitudinal de modèles animaux. Dans son utilisation "conventionnelle", cette technique utilise les protons de l'eau comme source de signal et permet d'obtenir des images anatomiques avec une bonne résolution spatiale de manière non invasive et non ionisante. Cependant, les lésions visibles en IRM apparaissent souvent à un stade déjà avancé de la maladie. De plus, comme l'eau est présente à la fois dans les compartiments intracellulaire et extracellulaire, cette méthode souffre d'un manque de spécificité qui rend difficile l'interprétation des résultats. Au contraire, la spectroscopie RMN est un moyen unique d'évaluer l'environnement cellulaire *in vivo*. En effet, les molécules observées en spectroscopie sont exclusivement intracellulaires et ont en général un rôle biochimique ainsi qu'une compartimentation cellulaire spécifique. C'est donc un outil prometteur pour comprendre le fonctionnement des cellules dans leur environnement et en particulier dans

l'organe complexe qu'est le cerveau. Plusieurs types de spectroscopie RMN ont été développés pour l'étude du vivant : la spectroscopie du proton, du phosphore 31, du carbone 13, de l'oxygène 17... Chacun de ces atomes étant un élément de base des molécules présentes dans les milieux biologiques, la spectroscopie RMN permet la quantification de molécules endogènes et par des techniques d'acquisition plus sophistiquées, d'accéder à des constantes dynamiques telles que les coefficients de diffusion des métabolites (ADC), la vitesse de synthèse d'ATP (V_{ATP}), la vitesse du cycle de Krebs (V_{TCA}) et la consommation d'oxygène cérébral ($CMRO_2$).

Depuis une dizaine d'années, l'équipe de spectroscopie RMN de l'unité de recherche CNRS URA 2210 travaille au développement de séquences de spectroscopie sensibles à la géométrie du milieu intracellulaire et permettant l'étude du métabolisme énergétique cérébral pour la recherche préclinique. L'objectif est d'identifier des biomarqueurs précoces précédant l'apparition de lésions visibles en imagerie ou de mettre au point des techniques permettant de mieux comprendre le fonctionnement des cellules dans leur environnement. Dans ce contexte, mon travail a consisté à développer et implémenter les approches de spectroscopie de diffusion 1H et de spectroscopie du phosphore sur le système RMN 7 Tesla de MIRCen. Les autres modalités (^{13}C et ^{17}O) sont également développées au sein du laboratoire et font actuellement l'objet d'une thèse menée par Chloé Najac.

Mon manuscrit s'articule autour de deux parties : 1) la spectroscopie de diffusion et 2) la spectroscopie du phosphore.

Pour commencer, le contexte expérimental est brièvement présenté et les principes généraux de la RMN sont rappelés.

Dans la partie consacrée à la spectroscopie de diffusion, le premier chapitre expose les différents mécanismes de transports existant dans les milieux biologiques. Le mouvement des métabolites est en effet complexe et dépend de nombreux paramètres, la restriction, l'encombrement intracellulaire, la viscosité du cytoplasme et la présence ou non de transport actif. Pour caractériser le mouvement, on définit le coefficient de diffusion apparent (ADC) par analogie avec la formule d'Einstein pour la diffusion libre : $ADC = \langle x^2 \rangle / 2t$, où x est la distance parcourue pendant le temps de mesure t (appelé par la suite temps de diffusion). Dans les tissus biologiques, deux types de phénomènes se distinguent de la diffusion libre par la dépendance de l'ADC au temps de diffusion : la diffusion encombrée et le transport actif. On parle de diffusion anormale. Les méthodes pour mesurer et caractériser la diffusion sont présentées dans le chapitre suivant et le principe de la spectroscopie de diffusion, utilisée par la suite, est décrit à cette occasion.

Afin de déterminer quels paramètres influent majoritairement sur le mouvement des métabolites et donc sur la mesure de l'ADC, une séquence de spectroscopie de diffusion à temps

de diffusion ultra-court a été développée pour observer l'évolution de l'ADC en fonction du temps de diffusion. Les résultats obtenus dans le cerveau de rat montrent que le transport des métabolites se fait essentiellement par diffusion aléatoire et que la contribution des transports actifs (s'ils existent) est négligeable. De plus, la modélisation des données a mis en évidence que la mesure par spectroscopie de diffusion à court temps de diffusion était sensible à la viscosité du cytoplasme et à l'encombrement à courte échelle, ce qui est en fait un biomarqueur potentiel de la neurodégénérescence.

Le dernier chapitre de la partie présente le travail réalisé lors d'une collaboration avec les laboratoires pharmaceutiques Eli Lilly et grâce auquel nous avons pu évaluer la sensibilité de la spectroscopie de diffusion aux variations précoces de viscosité, d'encombrement intracellulaire ou d'activation astrocytaire sur des souris transgéniques, modèle de taupathie (rTg4510). Le passage du rat à la souris étant critique en termes de sensibilité, une nouvelle séquence de diffusion maximisant la sensibilité tout en minimisant les biais a été développée. Les résultats obtenus à l'âge de 3 et 6 mois montrent des différences significatives d'ADC pour la plupart des métabolites renforçant l'idée que la mesure de diffusion peut être un biomarqueur précoce de la neurodégénérescence.

La deuxième partie est consacrée au développement d'une séquence de spectroscopie RMN du phosphore 31 P. Cette technique RMN permet d'observer des métabolites directement impliqués dans le processus énergétique (adénosine triphosphate, phosphocréatine, phosphate inorganique). Cependant, le développement de séquences en spectroscopie du phosphore se heurte à de nombreuses difficultés comme la faible sensibilité du noyau et les temps de relaxation T_2 très courts. Deux séquences sont proposées pour réaliser la localisation en limitant les pertes de signal : la séquence ISIS et la séquence OVS. Leur efficacité a été évalué au cours d'expériences sur fantôme phosphorylé. Puis des expériences préliminaires de mesure de pH dans le striatum de macaque, utilisant les deux séquences, ont été réalisées et sont présentées en fin de chapitre.

En fin de manuscrit, l'ensemble des communications scientifiques produites pendant cette thèse est donné en annexe.

Contexte expérimental

MIRCen

Cette thèse a été menée à MIRCen (Molecular Imaging Research Center), un laboratoire de la Direction des Sciences du Vivant du CEA. Ce laboratoire a pour vocations le développement de modèles animaux et l'évaluation de thérapies innovantes dans le domaine des maladies neurodégénératives, infectieuses et cardiaques.

Pour cela, MIRCen est constitué d'un ensemble de plateformes dédiées à la biologie moléculaire et virale, la chirurgie, les analyses comportementales, l'imagerie TEP et RMN, où ce travail a été réalisé, et le traitement des images.

Plateforme RMN

La plateforme RMN de MIRCen dispose d'un aimant horizontal Varian de 7 Tesla équipé de deux gradients :

- un gradient dédié primates : 29 cm de diamètre intérieur, $G_{max}=100$ mT/m, temps de montée de $325\ \mu s$
- un gradient dédié rongeurs : 12 cm de diamètre intérieur, $G_{max}=600$ mT/m, temps de montée de $250\ \mu s$

La correction des inhomogénéités de champ B_0 ("shim") se fait grâce à des bobines de gradients.

Le système est commandé par une console Linux avec le logiciel VnmrJ.



FIGURE I.2.1 – Scanner 7 Tesla de MIRCen.

Antennes radiofréquence

Les antennes radiofréquence utilisées dans cette thèse sont des antennes de surface en quadrature avec préamplificateurs intégrés de la marque Rapid Biomedical.



(a) Antenne souris.



(b) Antenne rat.



(c) Antenne singe.

FIGURE I.2.2 – Antennes utilisées pendant cette thèse.

- l'antenne souris (utilisée dans le chapitre 7)
- l'antenne rat (utilisée dans le chapitre 6)
- l'antenne singe (utilisée dans le chapitre 8)

Principes généraux

3.1 Principes de la RMN

Le phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire a été découvert en 1946 par deux équipes dirigées respectivement par Felix Bloch (Harvard) et Edward Purcell (Stanford). Ils reçoivent le prix Nobel pour leurs travaux en 1952.

Dans cette partie, nous faisons un bref rappel des principes de la RMN en insistant sur le choix des impulsions radiofréquence.

3.1.1 Etat d'équilibre - Effet Zeeman

L'observation d'un signal RMN n'est possible que si un noyau est pourvu d'un spin. Le noyau possède alors un moment magnétique $\vec{\mu}$ colinéaire au moment cinétique de spin nucléaire \vec{I} :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (3.1)$$

La constante de proportionnalité est le rapport gyromagnétique du noyau et est notée γ . En présence d'un champ magnétique extérieur \vec{B}_0 , orienté par convention selon z, les différentes orientations du moment cinétique de spin \vec{I} sont quantifiées dans la direction du champ :

$$I_z = \hbar m \quad (3.2)$$

avec \hbar la constante de Planck divisée par 2π et m le nombre quantique magnétique qui peut prendre $2I+1$ valeurs telles que $m=-I, -I+1, \dots, I-1, I$.

L'énergie d'interaction entre le moment magnétique nucléaire $\vec{\mu}$ et le champ B_0 s'écrit alors :

$$E_m = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = -\mu_z B_0 = -\gamma \hbar m B_0 \quad (3.3)$$

Et l'écart entre deux états d'énergie consécutifs vaut :

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad (3.4)$$

La levée de la dégénérescence des niveaux d'énergie E_m par l'application d'un champ magnétique est appelée effet Zeeman (figure I.3.1).

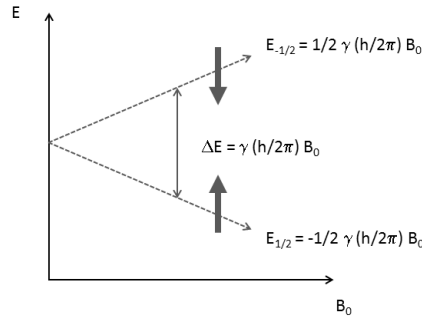


FIGURE I.3.1 – Levée de dégénérescence par application d'un champ magnétique : effet Zeeman (cas $I=1/2$).

Dans cette thèse, les noyaux étudiés sont le proton, ^1H , et le phosphore 31, ^{31}P , dont le nombre quantique I vaut $1/2$.

Pour ces noyaux, deux états d'énergie sont accessibles : Le niveau d'énergie $E_{1/2} = -1/2 \gamma \hbar B_0$ correspond à l'état d'équilibre stable, (i.e. spins orientés parallèlement au champ magnétique extérieur \vec{B}_0) alors que le niveau d'énergie $E_{-1/2} = 1/2 \gamma \hbar B_0$ correspond à l'état d'équilibre instable (i.e. spins orientés anti-parallèlement à \vec{B}_0).

Aimantation macroscopique

Intuitivement, on imagine que le nombre de spins dans l'état d'équilibre stable (spin up) va être plus important que dans l'état d'équilibre instable (spin down). En réalité, la différence entre les deux niveaux d'énergie est très faible. A l'équilibre thermique, elle est définie par la statistique de Boltzmann.

La différence de population entre les deux niveaux d'énergie conduit à une aimantation macroscopique M_0 , parallèle à \vec{B}_0 . Pour un échantillon contenant n spins par unité de volume, elle est donnée par la formule 3.5 :

$$M_0 = \left(\frac{\gamma \hbar}{2\pi} \right)^2 \left(\frac{n B_0}{4kT} \right) \quad (3.5)$$

Fréquence de Larmor

Il est possible d'induire une transition entre les deux niveaux d'énergie (et donc de sortir de l'équilibre thermique) en envoyant une onde radiofréquence d'énergie égale à l'écart entre

deux niveaux :

$$\Delta E = h\nu_0 \quad (3.6)$$

avec ν_0 la fréquence de Larmor définie comme la fréquence de l'onde permettant le passage d'un état d'énergie à un autre.

$$\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi \quad (3.7)$$

Les rapports gyromagnétiques du proton et du phosphore 31 sont respectivement $267.513 \times 10^6 \text{ rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$ et $108.291 \times 10^6 \text{ rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$. Pour un système RMN 7T, les fréquences de Larmor sont donc 298.032 MHz pour ^1H et 120.645 MHz pour ^{31}P .

En pratique, le champ annoncé par le fabricant n'est pas exactement le champ réel de l'aimant. Pour notre scanner Varian 7T, les fréquences mesurées sont 299.427 MHz pour ^1H et 121.207 MHz pour ^{31}P soit un champ effectif de 7.033 T.

Notion de déplacement chimique

La spectroscopie RMN aurait peu d'intérêt si tous les noyaux (définis par leur rapport gyromagnétique γ) résonnaient à la même fréquence. En réalité, la fréquence de résonance d'un noyau ne dépend pas exclusivement de γ et de B_0 , elle dépend aussi de son environnement chimique. Dans une molécule, le nuage électronique va induire un champ magnétique B_{induit} qui va s'opposer au champ magnétique extérieur B_0 . Le noyau va donc voir un champ effectif $\vec{B}_{\text{loc}} = \vec{B}_0 + \vec{B}_{\text{induit}}$. On parle d'écrantage ou de blindage.

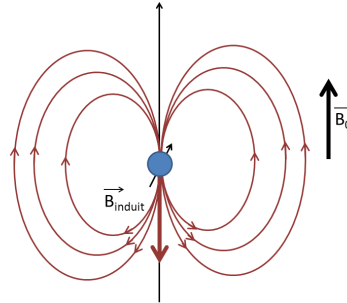


FIGURE I.3.2 – Représentation de l'écrantage généré par le nuage électronique d'un noyau en présence d'un champ extérieur.

Le champ induit est proportionnel au champ extérieur appliqué. La constante de proportionnalité est appelée constante d'écran et est notée σ . Le champ effectif vu par le noyau est donc :

$$B_{\text{loc}} = B_0(1 - \sigma) \quad (3.8)$$

Finalement, la résonance du noyau ne se produit plus à la fréquence de Larmor mais à la fréquence ν :

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_{\text{loc}} = \frac{\gamma}{2\pi} B_0(1 - \sigma) \quad (3.9)$$

La constante d'écran est indépendante du champ extérieur et ne dépend que de l'environnement électronique du noyau de la molécule. Chaque noyau aura, selon son environnement, une signature fréquentielle qui lui est propre, ce qui permet d'utiliser la spectroscopie RMN pour l'étude de molécules en chimie et en biologie.

Pour pouvoir comparer les spectres issus de spectromètres différents, on définit une fréquence normalisée, appelée déplacement chimique, qui est indépendante du champ B_0 .

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} 10^6 = (\sigma_{ref} - \sigma) 10^6 \quad (3.10)$$

δ est exprimé en ppm (partie par million).

3.1.2 Description vectorielle de la RMN - Equations de Bloch

Le principe de la mesure RMN consiste à exciter les spins (i.e. à les sortir de leur position d'équilibre) et à observer leur retour à équilibre. Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux états transitoires et aux phénomènes de relaxation.

Il existe plusieurs manières de décrire le mouvement des spins. La plus commode est d'assimiler l'aimantation macroscopique d'un système de spins à un dipôle magnétique \vec{M} et d'utiliser le formalisme vectoriel de la mécanique classique.

Certains phénomènes tels que le couplage ne pourront pas être étudiés avec ce formalisme. Il faut alors passer à la description quantique (non traitée dans cette thèse).

Pour un système de spins plongés dans un champ magnétique quelconque \vec{B} , l'aimantation \vec{M} vérifie l'équation 3.11.

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \wedge \gamma \vec{B} \quad (3.11)$$

Où \vec{M} est défini dans le référentiel du laboratoire (x,y,z) : $\vec{M} = M_x \vec{x} + M_y \vec{y} + M_z \vec{z}$.

Si le seul champ appliqué est le champ statique \vec{B}_0 , les spins individuels précessent autour de \vec{B}_0 à la fréquence de Larmor ν_0 (figure I.3.3). En moyenne, l'état d'équilibre de l'aimantation n'aura pas de composantes transverses du fait du déphasage des spins entre eux (\vec{M}/\vec{B}_0).

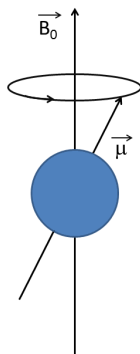


FIGURE I.3.3 – Précession d'un spin individuel autour du champ magnétique extérieur B_0 .

Pour observer l'aimantation nucléaire, il faut au préalable la faire basculer dans le plan transverse. En appliquant une onde radiofréquence dans le plan transverse, la composante longitudinale de l'aimantation diminue et on observe un basculement de l'aimantation globale dans le plan transverse.

En pratique, l'onde RF est générée par une bobine (appelée par la suite antenne) qui produit un champ oscillant $\vec{B}_1 = B_1 \cos(\omega_{RF}t) \vec{x} + B_1 \sin(\omega_{RF}t) \vec{y}$. Notons que la fréquence ω_{RF} n'est *a priori* pas égale à la pulsation de Larmor ω_0 .

L'aimantation dans le plan transverse précesse à la fréquence $\omega_0 = \gamma B_0$.

Une fois excités, les spins reviennent dans l'état d'équilibre par des phénomènes de relaxation :

- la relaxation T_1 qui correspond à un repeuplement des niveaux d'énergie dans leurs états d'équilibre. La composante M_z revient à sa valeur initiale M_0 selon un temps T_1 . On parle de relaxation longitudinale ou de relaxation spin-réseau.
- la relaxation T_2 qui correspond à une perte de cohérence spatiale des spins entre eux. Les composantes M_x et M_y tendent vers zéro selon un temps T_2 . On parle de relaxation transverse ou de relaxation spin-spin.

En prenant en compte l'équation 3.11 et les retours à l'équilibre des composantes M_x , M_y et M_z par relaxation T_1 et T_2 , on obtient les équations de Bloch qui régissent le mouvement de l'aimantation dans le référentiel du laboratoire (x,y,z) :

$$\begin{cases} \frac{dM_x}{dt} = \gamma(M_y B_0 + M_z B_1 \sin(\omega_{RF}t)) - \frac{1}{T_2} M_x \\ \frac{dM_y}{dt} = \gamma(M_z B_1 \cos(\omega_{RF}t) - M_x B_0) - \frac{1}{T_2} M_y \\ \frac{dM_z}{dt} = -\gamma(M_x B_1 \sin(\omega_{RF}t) + M_y B_1 \cos(\omega_{RF}t)) - \frac{1}{T_1} (M_z - M_0) \end{cases} \quad (3.12)$$

La résolution de ce système d'équation après une impulsion RF donne l'évolution de l'aimantation \vec{M} en fonction du temps :

$$\begin{cases} M_{x+iy}(t) = M_0 \exp(-t/T_2) \exp(-i(\omega_{RF} - \omega_0)t) \\ M_z(t) = M_0 + (M_z(t=0) - M_0) \exp(-t/T_1) \end{cases} \quad (3.13)$$

Référentiel tournant

Classiquement pour décrire le mouvement de l'aimantation lors de la manipulation de spins, on se place dans le référentiel tournant à la fréquence ω_{RF} (x', y', z'). Ce référentiel est défini de telle sorte que le champ radiofréquence B_1 soit statique. Sans perdre en généralité, on le prend par convention parallèle à x' (figure I.3.4).

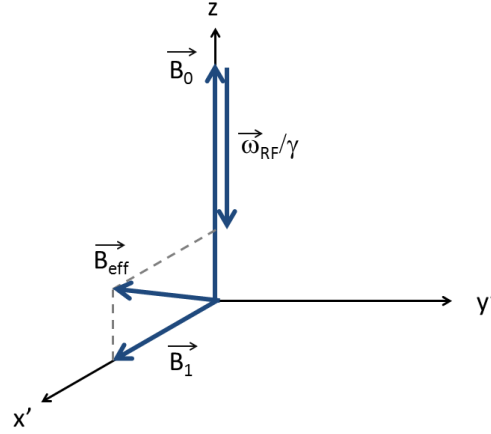


FIGURE I.3.4 – Définition du champ magnétique effectif dans le référentiel tournant.

Dans ce nouveau référentiel, le mouvement de l'aimantation \vec{M} est défini par la relation 3.14 :

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \wedge \gamma \vec{B}_{\text{eff}} \quad (3.14)$$

avec $\vec{B}_{\text{eff}} = \vec{B}_0 + \vec{B}_1 - \frac{\omega_{RF}}{\gamma} \vec{z}$ et $\vec{M} = M_{x'} \vec{x}' + M_{y'} \vec{y}' + M_{z'} \vec{z}'$.

Après excitation, l'aimantation \vec{M} précesse autour du champ effectif \vec{B}_{eff} à la fréquence $\omega_0 - \omega_{RF}$.

On se place dans ce référentiel pour décrire les impulsions radiofréquence (partie 3.2).

3.2 Impulsions radiofréquence

Les impulsions radiofréquence sont nécessaires à toute expérience de spectroscopie RMN pour réaliser la manipulation des spins (excitation, inversion, refocalisation).

Dans une séquence, une impulsion radiofréquence peut avoir des rôles différents si elle est appliquée seule ou en présence d'un gradient.

Appliquée seule, l'impulsion sert à manipuler les spins dont la fréquence de résonance est comprise dans la bande passante. On prendra donc une bande passante plus ou moins large selon que l'on veut sélectionner une ou plusieurs fréquences simultanément.

En présence de gradient, l'impulsion radiofréquence permet la localisation spatiale du signal RMN via la relation de linéarité $\omega(z) = \gamma(B_0 + zG_z)$ où G_z est le gradient appliqué dans la direction z (figure I.3.5).

Ainsi le profil de localisation (en orange) correspond à un facteur près au profil fréquentiel de l'impulsion (en vert).

Plusieurs paramètres rentrent donc en compte dans le choix d'une impulsion radiofréquence : sa bande passante et son profil fréquentiel mais aussi sa dépendance au champ B_1 .

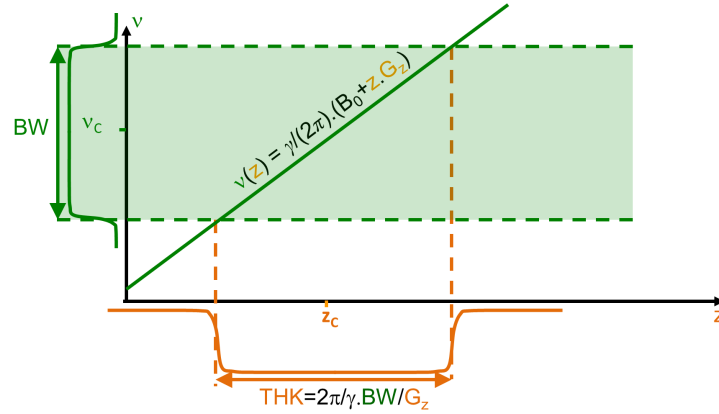


FIGURE I.3.5 – Principe de la localisation.

Dans la partie qui suit, nous détaillerons les paramètres caractéristiques d'une impulsion radiofréquence puis nous présenterons les impulsions utilisées lors de cette thèse, à savoir les impulsions carrées et les impulsions adiabatiques.

3.2.1 Paramètres d'une impulsion

Dans la suite du manuscrit, l'intensité du champ radiofréquence B_1 sera exprimé en Hz : $B_1(\text{Hz}) = \gamma / 2\pi \times B_1(\text{Tesla})$.

Profil fréquentiel et bande passante

Par définition, une impulsion radiofréquence correspond à l'application d'une onde radiofréquence pendant une durée T_p . La réponse fréquentielle d'une impulsion, appelée par la suite profil fréquentiel, est donnée, dans le cas des petits angles, par sa transformée de Fourier. Dans le cas général, il faut résoudre les équations de Bloch. La largeur de ce profil correspond à la bande passante de l'impulsion (notée BW pour Bandwidth).

L'impulsion radiofréquence a pour effet d'exciter tous les spins dont la fréquence de Larmor est comprise dans la bande passante. Selon l'application souhaitée, on prendra une impulsion à bande passante étroite pour sélectionner une résonance en particulier (suppression de l'eau, saturation de ATP_γ , CEST...) ou au contraire une impulsion à large bande pour exciter de manière non sélective un ensemble de spins.

La bande passante est un bon moyen pour caractériser une impulsion radiofréquence mais elle n'est pas suffisante. En RMN, les problèmes de spécificité sont primordiaux. Par exemple, pour la saturation d'une résonance, il faut faire attention à ne pas détruire le signal des autres pics. De même, lorsque l'on réalise une localisation, on souhaite que le signal reçu provienne uniquement de la zone choisie. Pour l'ensemble de ces applications, le profil idéal doit avoir des bords nets et ne pas présenter de lobes secondaires pour éviter les contaminations.

Artéfact de déplacement chimique

Dans les séquences de localisation en spectroscopie RMN, la position du voxel est calculée à partir de la fréquence centrale du spectre. Les métabolites ne résonnant pas tous à la même fréquence, les voxels sont décalés dans l'espace ce qui peut poser des problèmes de contamination (figure I.3.6).

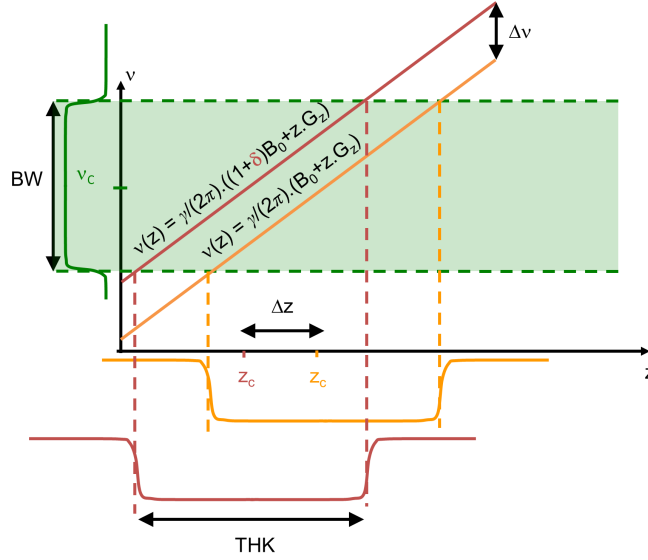


FIGURE I.3.6 – Artéfact de déplacement chimique.

Pour un métabolite résonnant à une fréquence ν différente de la fréquence central ν_c , on définit δ l'écart de déplacement chimique entre les deux résonances.

L'erreur de déplacement chimique, dans la direction z , s'écrit alors :

$$\frac{\Delta z}{\text{THK}} = \frac{\Delta \nu}{\text{BW}} = \frac{\gamma B_0 \delta}{2\pi \text{BW}} \quad (3.15)$$

Avec $\Delta \nu = \nu - \nu_c$ la fréquence centrale, BW la bande passante de l'impulsion radiofréquence, THK la taille du voxel dans la direction z et Δz , le décalage du voxel.

Plus le spectre est large et plus l'erreur est importante. Pour diminuer l'erreur de déplacement chimique, il faut augmenter la bande passante d'excitation.

Pour nos études, nous nous sommes fixé une erreur de déplacement chimique maximale de 10%. Pour le proton dont la largeur de spectre est 2 ppm, cela correspond à une bande passante minimale d'environ 6 kHz. Pour les mesures de flux métaboliques en phosphore, les pics qui nous intéressent sont compris entre le phosphate inorganique (Pi) et l'ATP $_{\gamma}$, soit une largeur de 8 ppm. La bande passante correspondante est 10 kHz.

Champ B_1

Le choix de l'impulsion est restreint par la valeur maximale du champ B_1 de l'antenne car pour réussir à exciter les spins, il faut envoyer une onde suffisamment puissante. Pour parer à cette limitation en puissance, les impulsions peuvent (entre autres) être rallongées mais cela pose d'autres problèmes tels que les pertes par relaxation, l'augmentation du temps d'écho et surtout la diminution de la bande passante qui peut induire des erreurs de déplacement chimique.

En plus de la valeur maximale du champ, une impulsion est en général sensible aux inhomogénéités de champ. Cette propriété est particulièrement critique avec les antennes de surface car les angles de basculement peuvent être différents selon l'endroit où l'on se place.

3.2.2 Impulsions carrées

La manière la plus simple pour exciter les spins est d'envoyer une onde RF d'amplitude constante B_1 pendant une durée T_p , à la résonance ($\omega_{RF} = \omega_0$), l'aimantation précesse autour de l'axe x' avec un angle de bascule final proportionnel à la durée d'application de l'impulsion :

$$\theta = \gamma B_1 T_p \quad (3.16)$$

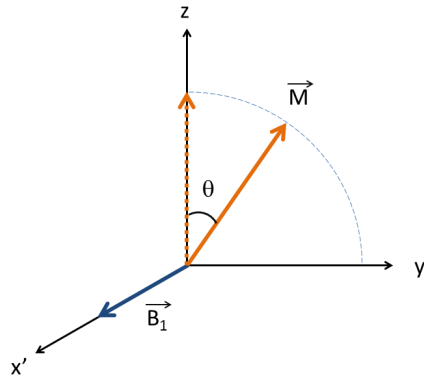


FIGURE I.3.7 – Définition de l'angle de basculement θ .

Les impulsions carrées ont l'avantage de pouvoir réaliser n'importe quel angle de basculement θ . Cependant leur utilisation avec les antennes de surface n'est pas optimale. En effet, le champ B_1 généré par ces antennes n'est pas homogène dans l'espace. Les angles de basculement ne sont donc pas identiques dans l'ensemble de l'échantillon. De plus, les profils fréquentiels sont des sinus cardinaux et présentent donc des lobes secondaires, ce qui ne permet pas une localisation très propre et peut poser des problèmes de contamination (figure I.3.8).

En pratique, on utilise souvent cette impulsion pour réaliser une excitation uniforme sur

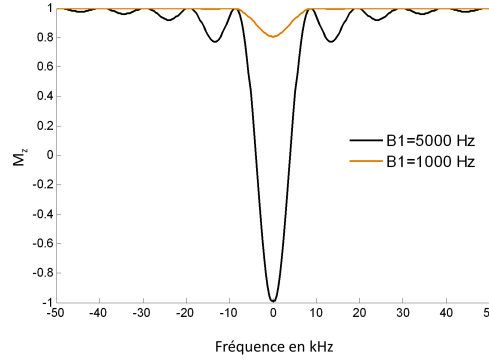


FIGURE I.3.8 – Evolution de l'aimantation longitudinale M_z en fonction de la fréquence de résonance en Hz pour l'impulsion carrée $T_p=200 \mu s$ dans le cas où $B_1=5000$ Hz (noir) et $B_1=1000$ Hz.

une large gamme de fréquence. En prenant une durée très courte, de l'ordre de la dizaine de microseconde, on atteint des bandes passantes de l'ordre de 100 kHz. Pour cela, il faut toutefois pouvoir appliquer un champ B_1 suffisamment élevé.

3.2.3 Impulsions adiabatiques d'inversion

Dans cette thèse, l'utilisation d'antennes de surface a nécessité l'utilisation d'impulsions radiofréquence qui réalisaient des inversions et refocalisations parfaites dans toutes les zones de l'espace indépendamment du champ B_1 généré par les antennes. Nous avons donc choisi les impulsions adiabatiques AFP (Adiabatique Full Passage) (Garwood & DelaBarre, 2001) qui possèdent la propriété bien connue d'être insensibles aux inhomogénéités du champ radiofréquence sur une large gamme de fréquence.

3.2.3.1 Principe

Le principe des impulsions adiabatiques est basé sur la modulation en fréquence. Dans le référentiel tournant à la fréquence de l'impulsion ω_{RF} , l'aimantation a un mouvement de rotation à la fréquence apparente de $\omega_0 - \omega_{RF}$ autour du champ effectif \vec{B}_{eff} (figure I.3.9).

Dans nos études, nous avons utilisé des impulsions adiabatiques sécantes hyperboliques dont les fonctions de modulation sont données par les équations (3.17) et (3.18) pour les modulations en amplitude et en fréquence respectivement. Pour simplifier les expressions, on introduit le temps normalisé τ tel que $\tau = 2t/T_p - 1$, $0 \leq t \leq T_p$. τ varie entre -1 et 1.

$$\omega_1 = \omega_1^{max} \text{sech}(\beta \tau^n) \quad (3.17)$$

$$\omega_{RF} = \omega_c + A \int_0^\tau \text{sech}^2(\beta \tau'^m) d\tau' \quad (3.18)$$

avec

$$A = \frac{R}{4} \left(\int_0^1 \text{sech}^2(\beta \tau'^m) d\tau' \right)^{-1} \quad (3.19)$$

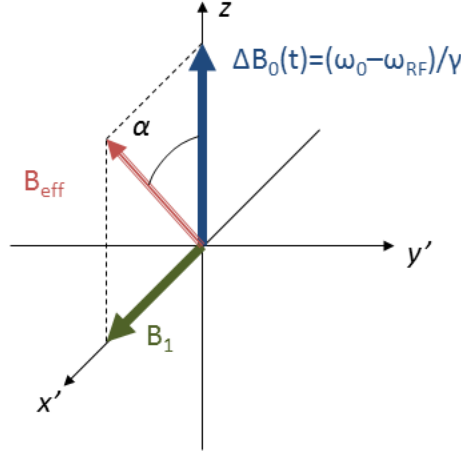


FIGURE I.3.9 – Champs effectif vu par les spins lors de l'inversion.

β constante

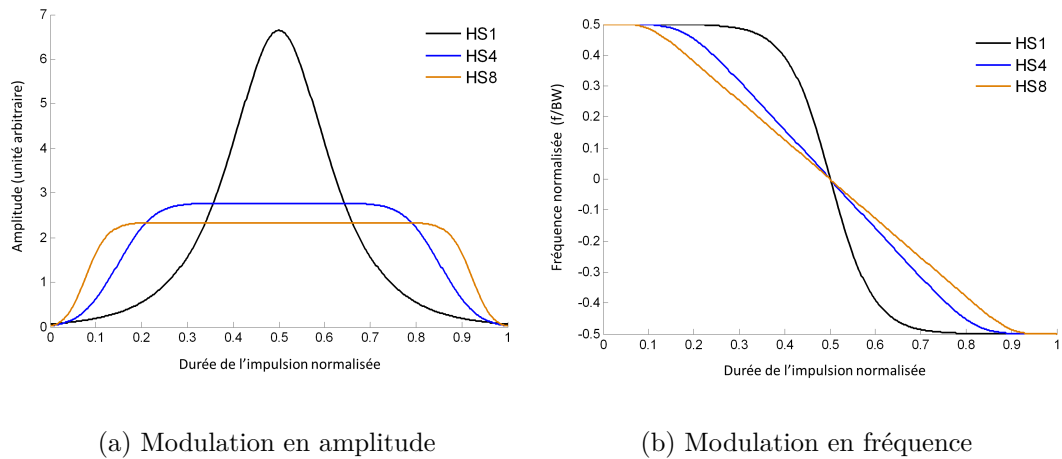
n ordre de l'impulsion adiabatique

T_p durée de l'impulsion

R produit bande passante $\times T_p$

Il est possible de choisir la bande passante de l'impulsion pour une durée T_p donnée en changeant son rapport R .

Les graphes 3.10(a) et 3.10(b) montrent respectivement la modulation en amplitude et en fréquence pour l'impulsion d'ordre 1, 4 et 8.



(a) Modulation en amplitude

(b) Modulation en fréquence

FIGURE I.3.10 – Modulation en amplitude et en fréquence des impulsions HS1 (noir), HS4 (bleu) et HS8 (orange).

Au début de l'impulsion, les modulations en phase et en amplitude de l'impulsion varient lentement. Le champ effectif dévie donc lentement de l'axe z . Puis vers le milieu de l'impulsion, les modulations varient plus vite : le passage dans le plan transverse est donc rapide.

Enfin, de manière symétrique, pendant la fin de l'impulsion, le champ effectif revient lentement parallèle à l'axe z . Dans le cas de l'inversion (quand l'aimantation est initialement selon z), l'aimantation précesse dans un cône très proche du champ effectif. Cette propriété d'adiabaticité est toutefois soumise à la condition que la vitesse de précession des spins autour du champ effectif est grande devant la vitesse de basculement de ce champ ($d\alpha/dt \ll B_{eff}$). Concrètement, cela se traduit par une valeur seuil de B_1 au dessus de laquelle l'angle de basculement est constamment égal à 180° .

Sur la figure I.3.10, on constate que la modulation en amplitude change beaucoup d'un ordre à un autre 3.10(a) : en effet, le principal avantage des ordres supérieurs à un est d'étaler la distribution de B_1 de manière plus uniforme pendant toute la durée de l'impulsion. De ce fait, la puissance radiofréquence maximale nécessaire à l'inversion est beaucoup moins importante. Le seuil d'adiabaticité B_s est donc diminué (figure 3.12(a)).

Cas de la refocalisation

Quand l'aimantation est initialement dans le plan transverse, la modulation en fréquence de l'impulsion a pour conséquence l'apparition d'une phase non linéaire.

En posant $\Phi_{B_1}(t)$ la phase de l'impulsion adiabatique au temps t et en supposant que le 180° se produit instantanément à l'instant t_Ω (moment où la fréquence de l'impulsion est égale à la fréquence de Larmor Ω), on peut écrire l'évolution de la phase de l'aimantation $\Phi(t)$ pendant la durée T_p de l'impulsion :

- Avant le 180° , $0 \leq t < t_\Omega$: $\Phi(t) = \Omega t$.
- Juste après le 180° : $\Phi(t_\Omega^+) = 2\Phi_{B_1}(t_\Omega) - \Omega t_\Omega$.
- Après le 180° , $t_\Omega \leq t < T_p$: $\Phi(t) = 2\Phi_{B_1}(t_\Omega) + \Omega(t - 2t_\Omega)$.
- A la fin de l'impulsion : $\Phi(T_p) = 2\Phi_{B_1}(t_\Omega) + \Omega(T_p - 2t_\Omega)$.

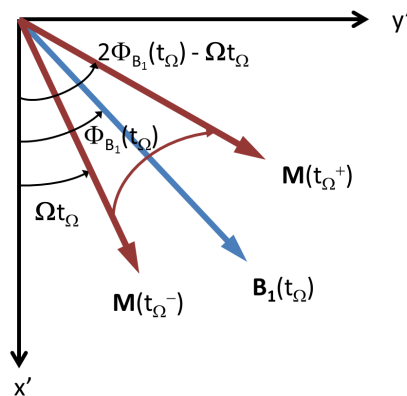


FIGURE I.3.11 – Evolution de l'aimantation transverse M au moment de la rotation autour de B_1 .

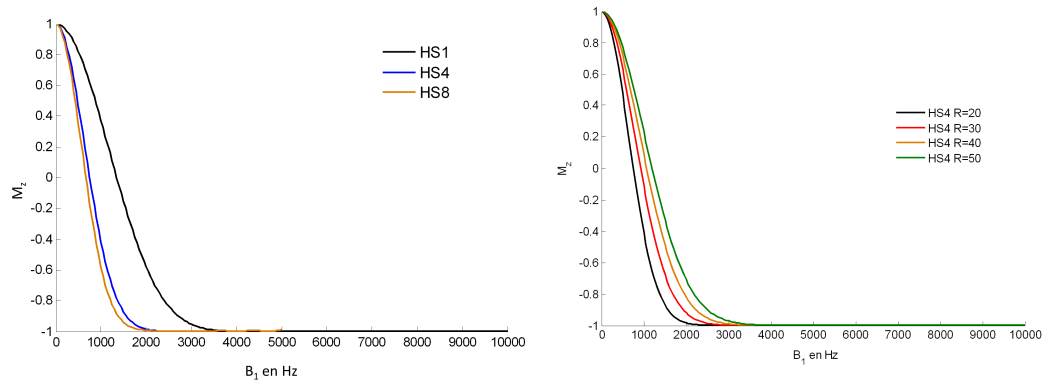
Cette phase non linéaire acquise peut être refocalisée par l'application d'une deuxième impulsion. C'est ce qui est fait dans la séquence de localisation LASER utilisée dans les chapitres 6 et 7.

3.2.3.2 Choix des impulsions adiabatiques

Pour comparer les différentes impulsions adiabatiques, un programme de simulation des équations de Bloch a été développé sur Matlab. Il permet de déterminer l'évolution de l'aimantation en fonction du champ B_1 (détermination du seuil d'adiabaticité), de la fréquence (calcul des profils fréquentiels) et du temps (pertes par relaxation).

Le choix de l'impulsion adiabatique va dépendre du champ B_1 "moyen" dans le volume vu par l'antenne. Les impulsions dont le seuil d'adiabaticité est supérieur à cette valeur ne seront pas retenues. De plus, pour nos applications, les impulsions ayant une bande passante inférieure à 10 kHz sont rejetées.

Comme énoncé précédemment, le seuil d'adiabaticité diminue quand l'ordre de l'impulsion augmente : 4000 Hz pour l'ordre 1 et 2200 Hz pour les ordres 4 et 8. La différence entre les ordres 4 et 8 est si faible qu'on mesure une valeur seuil quasi identique pour les deux (figure 3.12(a)).



(a) Impulsions HS1 (noir), HS4 (bleu) et HS8 (orange) de rapport $R=20$ et de durée 2 ms ($BW=10$ kHz).

(b) Impulsions d'ordre $n=4$ de rapport $R=20$ (noir), $R=30$ (rouge), $R=40$ (orange) et $R=50$ (vert) et de durée 2 ms.

FIGURE I.3.12 – Evolution de l'aimantation longitudinale M_z en fonction du champ radiofréquence B_1 pour des impulsions de durée 2 ms d'ordres variables (a) et de rapports variables (b).

Au contraire, pour une durée d'impulsion fixe, quand R augmente (i.e. bande passante qui augmente), le seuil d'adiabaticité augmente (figure 3.12(b)). Réciproquement, l'augmentation de la durée de l'impulsion diminue le seuil.

Le problème qui se pose lorsque l'on utilise une impulsion adiabatique est de savoir com-

ment diminuer le seuil d'adiabaticité pour que celui-ci soit compatible avec les antennes à disposition. Au regard de ce qui a été montré ci-dessus, plusieurs options sont possibles :

- augmenter l'ordre
- augmenter la durée de l'impulsion
- diminuer la bande passante

Toutes ces propositions présentent des contreparties comme par exemple la dégradation des profils d'ordre supérieur à 1 (figure I.3.13).

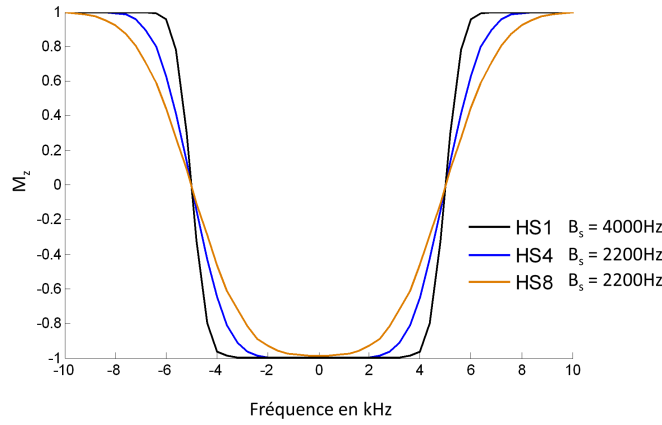


FIGURE I.3.13 – Evolution de l'aimantation longitudinale M_z en fonction de la fréquence de résonance en Hz pour les impulsions HS1 (noir), HS4 (bleu) et HS8 (orange) de rapport $R=20$ et de durée 2 ms ($BW=10$ kHz). La valeur de B_1 est prise égale à la valeur du seuil d'adiabaticité B_s .

De plus, les pertes par relaxation T_2 sont plus importantes avec les ordres supérieurs car l'aimantation reste plus longtemps dans le plan transverse (figure I.3.14).

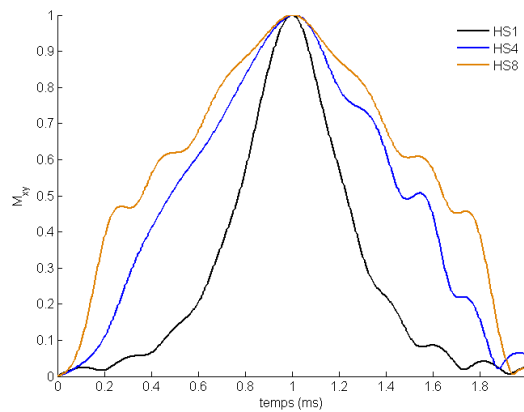


FIGURE I.3.14 – Evolution de l'aimantation transverse M_{x+iy} pendant l'application de l'imp pour les impulsions HS1 (noir), HS4 (bleu) et HS8 (orange) de rapport $R=20$ et de durée 2 ms ($BW=10$ kHz). La valeur de B_1 est prise égale à la valeur du seuil d'adiabaticité B_s .

Dans le cas du phosphore, les pertes ont été évaluées par simulations numériques pour les impulsions présentées sur la figure I.3.13 ($T_p=2$ ms, $R=20$). Elles sont de 5% pour l'ordre 1,

de 11% pour l'ordre 4 et de 12% pour l'ordre 8.

De même, les pertes par relaxation augmentent avec la durée de l'impulsion.

Enfin, il n'est pas possible de réduire trop la bande passante pour des raisons d'erreur de déplacement chimique (cf partie 3.2.1).

Finalement, le choix des impulsions adiabatiques constitue un compromis entre les différents paramètres présentés. Pour nos études, les différentes impulsions adiabatiques ont été comparées en termes de seuil d'adiabaticité, de bande passante et de pertes par relaxation. L'impulsion HS4, $R=20$ de durée $T_p=2$ ms ($BW=10$ kHz) réalisait le meilleur compromis avec nos antennes. En particulier, il n'y avait pas de gain à prendre des impulsions d'ordre supérieur car le gain en terme de seuil d'adiabaticité était très faible (même seuil pour les impulsions HS4 et HS8, $T_p=2$ ms, $R=20$, figure 3.12(a)) alors que les profils étaient fortement dégradés (figure I.3.13). Elle sera donc utilisée par la suite dans nos séquences pour réaliser les inversions et les refocalisations.

Deuxième partie

Spectroscopie de diffusion

Mécanismes de transport des molécules dans les milieux biologiques

4.1 Phénomène de diffusion

Un phénomène de diffusion est un phénomène de transport de particules sans mouvement macroscopique du fluide. Ce phénomène conduit à l'homogénéisation des milieux fluides (gaz ou liquide).

Considérons une particule évoluant dans un fluide. On peut décrire la probabilité de chocs par le libre parcours moyen qui définit la distance moyenne que parcourt une particule entre deux collisions. Dans les liquides, ce libre parcours moyen est de l'ordre de quelques dixièmes de nanomètres, et 1000 fois plus élevé dans les gaz. Lors d'un mouvement de quelques millimètres, une particule va donc rencontrer de nombreuses particules qui vont la dévier de sa trajectoire initiale. La trajectoire de la particule apparaît comme aléatoire. On parle alors de diffusion brownienne.

L'agitation thermique est à l'initiative du mouvement des particules. D'un point de vue énergétique, une particule acquiert une énergie cinétique proportionnelle à la température T par l'intermédiaire de la constante de Boltzmann k :

$$E_c = \frac{3}{2}kT \quad (4.1)$$

La force de frottement visqueux \vec{F} , au contraire, freine la particule. On peut montrer que dans le cas d'un écoulement non turbulent, il y a une relation de proportionnalité entre cette force et la vitesse de la particule (\vec{v}). On introduit K le coefficient de résistance de la

particule dans le fluide considéré tel que :

$$\vec{F} = -K\vec{v} \quad (4.2)$$

Finalement, en faisant un bilan énergétique sur une particule sphérique en état stationnaire ($K = 6\pi\nu R_H$), on obtient la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (4.3)$$

avec R_H le rayon hydrodynamique, η la viscosité dynamique du fluide et ν la viscosité cinématique.

Cette formule est valable pour les milieux dilués dans lesquels on peut négliger le volume occupé par les particules de fluide. Dans le cas de milieux plus concentrés, on remplace R_H par $(1+2.5\Phi)R_H$, où Φ est la fraction volumique occupée par les particules observées.

Pour un phénomène de diffusion brownien, la probabilité P pour une molécule se trouvant initialement en \vec{r}_0 d'être à un instant t en \vec{r} est solution de l'équation de Laplace pour la diffusion :

$$\frac{\partial P}{\partial t} - D\Delta P = 0 \quad (4.4)$$

Δ étant le laplacien. Dans cette équation, on remarque la dérivée simple par rapport au temps qui est caractéristique des phénomènes irréversibles.

La résolution de (4.4) dans un milieu non restreint donne une distribution de probabilité gaussienne :

$$P(\vec{r}/\vec{r}_0) = \left(\frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}}\right)^3 \exp\left(\frac{-(\vec{r} - \vec{r}_0)^2}{4Dt}\right) \quad (4.5)$$

La projection sur l'axe x donne la formule :

$$P(x/x_0) = \left(\frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}}\right) \exp\left(\frac{-(x - x_0)^2}{4Dt}\right) \quad (4.6)$$

On déduit des deux expressions (4.5) et (4.6), la formule d'Einstein

– dans un espace à trois dimensions :

$$\langle (\vec{r} - \vec{r}_0)^2 \rangle = \int_r P(\vec{r}/\vec{r}_0) (\vec{r} - \vec{r}_0)^2 = 6Dt \quad (4.7)$$

– dans un espace à une dimension :

$$\langle (x - x_0)^2 \rangle = 2Dt \quad (4.8)$$

4.2 Diffusion *in vivo* et notion de diffusion anormale

Dans les milieux biologiques coexistent deux types de transport : les phénomènes diffusifs décrits précédemment et les transports actifs qui nécessitent une source d'énergie et sont accompagnés de mouvements macroscopiques de matière (ex : transports trans-membranaires, vésiculaires et courants cytoplasmiques). Le coefficient de diffusion mesuré n'est plus égal au coefficient de diffusion libre mais à un coefficient de diffusion apparent (ADC pour Apparent Diffusion Coefficient) que l'on définit par analogie avec la relation d'Einstein :

$$\text{ADC} = \frac{\langle x^2 \rangle}{2t} \quad (4.9)$$

4.2.1 Diffusion encombrée

L'espace intracellulaire est caractérisé par la présence d'un cytosquelette (filament d'actine, microtubules) et de nombreux organelles (mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, ribosome...). La diffusion *in vivo* n'est donc pas libre. On distingue deux phénomènes liés à la présence d'obstacles dans un milieu : la restriction et la tortuosité.

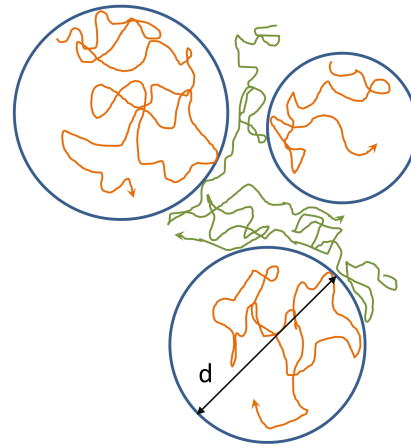
- Dans le premier cas, les molécules sont confinées dans un espace clos délimité par la présence de membranes (ex : cellules, organelles...). En pratique, la distance quadratique moyenne que parcourt une molécule est limitée par la taille d de la cellule ou de l'organelle dans laquelle elle évolue : $\langle x^2 \rangle \leq \langle d^2 \rangle$ (trajectoire en orange sur la figure 4.1(b)).
- Dans le deuxième cas, à l'inverse, les molécules peuvent aller en n'importe quel point de l'espace mais leur trajet est entravé par la présence d'obstacles qui les empêchent de décrire une ligne droite (ex: labyrinthe infini). La présence d'un cytosquelette et d'organelles dans le cytoplasme fait de l'intérieur d'une cellule un milieu tortueux ((trajectoire en vert sur la figure 4.1(b)).

Les milieux biologiques sont une combinaison de ces deux phénomènes. Il est difficile en pratique d'isoler la restriction de la tortuosité et réciproquement. Par la suite, on parlera donc de diffusion encombrée pour désigner la diffusion en présence d'obstacles.

In vivo, l'ordre de grandeur pour la distance inter-obstacle (diamètre des fibres, distance entre organelles...) est environ $1 \mu\text{m}$. Pendant leur mouvement, les molécules contenues dans le cytoplasme vont donc subir de nombreux chocs avec les différents obstacles. Leur trajectoire va en être modifiée et la distance parcourue sera plus courte que si le milieu était libre et homogène. Si l'on reprend la formule d'Einstein sur la diffusion (4.8), on en déduit que l'ADC, sera inférieur au coefficient de diffusion libre D_{free} .



(a) Vision graphique du cytoplasme d'une cellule avec les différents composants (microtubules, filaments, ribosomes) à l'échelle et dans les bonnes concentrations. Dessin récupéré sur le site de DS Goodsell : <http://mgl.scripps.edu/people/goodsell>.



(b) Description des deux phénomènes de diffusion encombrée : la diffusion restreinte en orange et la diffusion tortueuse en vert. Le passage à travers les membranes est impossible.

FIGURE II.4.1 – Encombrement cellulaire et diffusion encombrée.

Dans la diffusion encombrée, l'ADC dépend du coefficient de diffusion libre D_{free} (lui même dépendant de la viscosité du fluide et de la taille des molécules), de la géométrie du milieu et enfin du temps de la mesure. En effet, plus le temps de mesure est court, moins les molécules sont sensibles à l'encombrement et plus on se rapproche de la diffusion libre. Inversement, plus le temps de mesure est long, plus les molécules rencontrent d'obstacles et plus la mesure de diffusion est sensible à l'encombrement. Finalement, l'ADC vaut D_{free} pour un temps de mesure nul et diminue quand le temps de mesure augmente.

Dans le cas la diffusion restreinte, $\langle x^2 \rangle$ étant borné, la valeur de l'ADC à temps de mesure infini est nulle. Dans le cas de la diffusion tortueuse, $\langle x^2 \rangle$ devient proportionnelle au temps de mesure. L'ADC est alors indépendant du temps et tout se passe comme si la diffusion était libre dans un milieu plus visqueux. On introduit la tortuosité T telle que $ADC = \frac{D_{free}}{T^2}$. Dans cette expression, ηT^2 peut être vu comme une viscosité apparente (avec η la viscosité du milieu).

4.2.2 Transports actifs

Parallèlement à la diffusion encombrée, des transports actifs existent dans les cellules. Ces types de transports permettent l'acheminement de molécules (protéines, lipides, ions) d'un site à l'autre (synthèse, utilisation et dégradation). Il en existe de plusieurs sortes :

- Les transports membranaires : passage de molécules contre leur gradient de concentration grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP.
ex : la pompe Na^+/K^+
- Les transports assistés s'effectuant le long des microtubules et des filaments d'actine. Dans ce processus, des protéines dites "motrices" se lient aux microtubules ou aux filaments d'actine et changent de conformation pour se déplacer le long des filaments dans un sens donné. En migrant, elles peuvent entraîner avec elles des molécules, des vésicules ou même des organelles.
ex : transport de vésicules contenant des macromolécules et transport de mitochondries le long des microtubules des cellules eucaryotes.
- Les courants cytoplasmiques qui sont par définition des flux du cytosol. Ces courants résultent de transitions sol-gel du cytoplasme liées à la réorganisation des filaments d'actine et à la synérèse du cytoplasme (Ce procédé chimique consiste à séparer puis expulser la phase liquide d'une phase gel. Il est utilisé pour le déplacement des organismes unicellulaire amiboïdes).
ex : déplacement des chloroplastes chez les végétaux, migration du patrimoine génétique pendant la mitose chez les mammifères (observée récemment dans les ovocytes de souris (Yi *et al.*, 2011)) et plus tôt dans des cellules cancéreuses du poumon chez l'homme (Sherwin *et al.*, 1967).

Parmi les transports actifs présentés, les transports membranaires peuvent être négligés. En effet, les échanges se font dans des petits volumes et sur de courtes distances. La contribution de ces phénomènes sur les mesures de diffusion sera infime.

Notons qu'à notre connaissance, les courants cytoplasmiques n'ont jamais été observés dans les cellules du cerveau (neurones ou astrocytes). Néanmoins, ils sont parfois présentés comme essentiels à toute vie cellulaire (Agutter *et al.* (1995), Wheatley (1998), Wheatley (1999)) reléguant la diffusion à un phénomène accessoire car inefficace.

Les transports actifs sont des mécanismes qui facilitent le déplacement des molécules d'un site à l'autre. Il paraît évident que les différents transports actifs permettent un transport plus efficace que la simple diffusion. Pour comparer le transport actif aux autres phénomènes de transport, on définit de la même façon que pour la diffusion (libre ou encombrée) un coefficient de "diffusion" effectif (ADC). Les distances parcourues en moyenne par les molécules étant plus longues que si elles diffusaient librement, l'ADC est plus grand que D_{free} . Dans le cas des très courts temps de mesure, les molécules sont à peine embarquées dans le transport actif. L'ADC est donc très proche de D_{free} . Finalement, comme pour la diffusion encombrée, le coefficient de diffusion pour le transport actif dépend du temps.

4.2.3 Notion de diffusion anormale

Les deux types de transports présents dans les tissus biologiques, diffusion encombrée et transport actif, se distinguent de la diffusion libre par la dépendance de leur coefficient de diffusion en fonction du temps. On regroupe les deux phénomènes sous le nom de "diffusion anormale".

Définition

Pour la diffusion libre, $\langle x^2 \rangle$ varie de manière linéaire avec le temps de mesure. Toute déviation de ce comportement est référencé comme "diffusion anormale". Les phénomènes de diffusion anormale sont décrits, de manière approximative, en utilisant une loi de puissance : $\langle x^2 \rangle \propto t^\alpha$.

Pour $\alpha = 1$, on retrouve la diffusion libre.

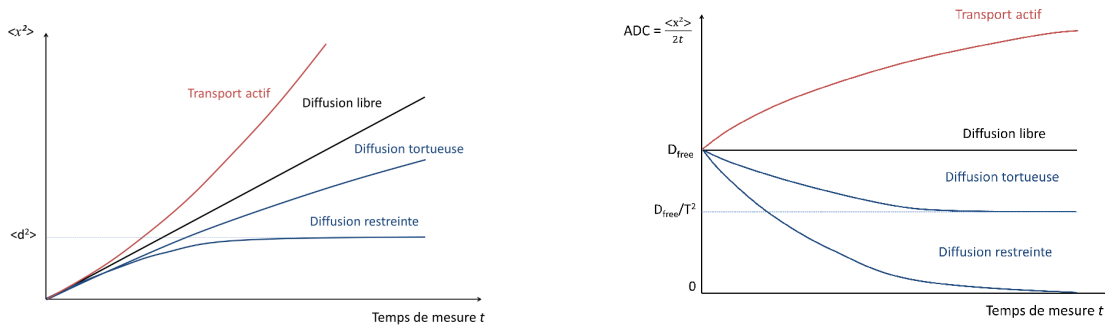
Si $\alpha > 1$, on parle de superdiffusion. La distance parcourue en fonction du temps augmente plus vite qu'en diffusion libre. C'est le cas des transports actifs.

Si $\alpha < 1$, on parle de subdiffusion. La distance parcourue en fonction du temps augmente moins vite qu'en diffusion libre. C'est le cas de la diffusion encombrée (tortueuse ou restreinte).

Le coefficient de diffusion effectif est défini comme pour la diffusion libre :

$$\text{ADC} = \frac{\langle x^2 \rangle}{2t} \propto t^{\alpha-1} \quad (4.10)$$

Les variations des distances quadratiques moyennes et des coefficients de diffusion en fonction du temps de mesure pour les différents types de diffusion anormale sont données dans la figure II.4.2.



(a) Variation de la distance quadratique moyenne en fonction du temps de mesure

(b) Variation de l'ADC en fonction du temps de mesure

FIGURE II.4.2 – Description de la diffusion anormale.

Sur la figure 4.2(a) sont représentées les lois de puissance qui régissent la diffusion restreinte/encombrée et le transport actif. Toutes les courbes tendent vers l'infini sauf celle de la diffusion restreinte qui atteint une asymptote $\langle x^2 \rangle = \langle d^2 \rangle$ où d est la taille du compartiment dans lequel évolue la molécule.

En ce qui concerne la variation du coefficient de diffusion, l'ADC diminue quand le temps de diffusion augmente pour la diffusion encombrée :

- Pour la diffusion restreinte, $\langle x^2 \rangle$ étant borné, l'ADC tend vers zéro.
- Pour la diffusion tortueuse, l'ADC tend vers une valeur non nulle $\frac{D_{free}}{T^2}$ (avec T la tortuosité du milieu).

Pour le transport actif, l'ADC augmente avec le temps de mesure.

Il est possible de distinguer les deux types de transports en regardant la variation de l'ADC en fonction du temps de diffusion.

Description fréquentielle de la diffusion anormale

La diffusion anormale est définie dans le domaine temporel. Cependant, il est possible d'utiliser une autre description qui sera utile pour la suite : la description fréquentielle et le formalisme de la fonction d'autocorrélation des vitesses.

Dans le domaine fréquentiel, le coefficient de diffusion est défini comme la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation des vitesses (FAV) :

$$\text{FAV}(t) = \langle v(t)v_0 \rangle \quad (4.11)$$

$$D(\omega) = \frac{1}{2} \int_0^\infty \langle v(t)v_0 \rangle \exp(i\omega t) dt \quad (4.12)$$

Dans le cas de la diffusion encombrée, le choc d'une molécule avec un obstacle entraîne un changement de sens de la vitesse. La FAV est donc négative (figure 4.3(a)). En faisant la transformée de Fourier de la FAV, on obtient le spectre de diffusion donné par la figure 4.3(b). Sur ce graphe, on voit que l'ADC augmente avec la fréquence (le spectre étant symétrique, seules les fréquences positives sont considérées). Intuitivement, cela correspond à une diminution de l'ADC à temps de diffusion long.

Pour le transport actif, les vitesses gardent la même orientation pendant une certaine durée, ce qui conduit à une FAV positive (figure 4.3(c)). En faisant la transformée de Fourier, on constate que l'ADC diminue quand la fréquence augmente.

Les deux types de transports ont un comportement similaire aux hautes fréquences (i.e. quand le temps de diffusion tend vers zéro), le spectre de diffusion tend vers le coefficient de

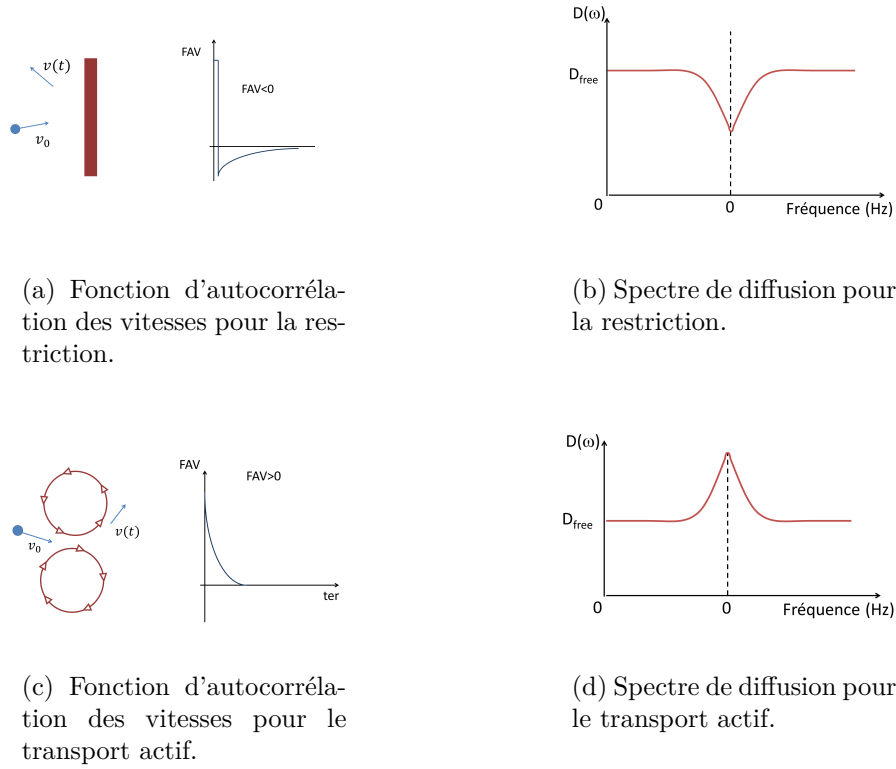


FIGURE II.4.3 – Fonctions d'autocorrélation des vitesses et spectres de diffusion dans le cas de la diffusion restreinte 4.3(a) et 4.3(b) and dans le cas du transport actif 4.3(c) et 4.3(d).

diffusion libre D_{free} . Pour discriminer les deux types de transports, il faut donc échantillonner le spectre de diffusion dans la zone de transition.

Cette méthode est une alternative à l'étude de la diffusion anormale dans le domaine temporel. Elle sera utilisée dans le chapitre 6.

Mesure de diffusion dans les milieux biologiques

5.1 Techniques de mesure de la diffusion *in vivo*

Pour mesurer la diffusion dans les milieux biologiques plusieurs méthodes optiques ont été développées. La plus simple, le Single Particle Tracking (SPT), consiste à suivre un ensemble de particules puis à appliquer directement la relation d'Einstein dans un plan optique en 2 dimensions $\langle (x - x_0)^2 \rangle = 2Dt$ pour calculer D (Barak & Webb, 1982).

D'autres techniques sont basées sur la mesure de la fluorescence totale d'une partie de l'échantillon. Pour la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS), la fluorescence de l'échantillon est enregistré pendant environ une seconde. Comme les molécules bougent dans le milieu, des fluctuations de signal sont observées. On calcule le coefficient d'autocorrélation des fluctuations de fluorescence à différents temps. Ce coefficient est relié à l'exposant α de la diffusion anormale ($\langle (x - x_0)^2 \rangle \propto t^\alpha$) et donc au coefficient de diffusion ($ADC \sim t^{\alpha-1}$). La FCS a été utilisée pour caractériser la diffusion anormale de protéines dans différents types cellulaires. Une revue a été publiée récemment sur le sujet (Malchus & Weiss, 2010). Une autre méthode de mesure de la diffusion utilisant la fluorescence est la redistribution de fluorescence après photoblanchiment (en anglais FRAP pour Fluorescence Recovery After Photobleaching). Elle consiste à inhiber la fluorescence dans la zone d'intérêt en utilisant un flash lumineux. Comme les molécules sont libres de se déplacer dans l'ensemble de l'échantillon, le système va s'homogénéiser et la fluorescence va revenir dans la zone initialement "blanchie". Ce retour de la fluorescence est relié au coefficient de diffusion (Axelrod *et al.* (1976), Kreis *et al.* (1982)). De manière analogue, il est possible d'encapsuler une molécule fluorescente pour la rendre non fluorescente. Cet effet est réversible grâce à l'application d'une brève exposition UV qui libère la molécule. La fluorescence apparaît alors dans la zone illuminée puis diminue du fait des mouvements dans l'échantillon (Wang & Augustine, 1995). On étudie la diminution du signal de la même façon que l'augmentation du signal dans la

technique FRAP. Cette technique a été utilisée avec le dextran fluorescent dans les dendrites des cellules de Purkinje (Santamaria *et al.*, 2006). Les temps de mesure de ces différentes techniques de fluorescence sont de l'ordre de quelques millisecondes à quelques dizaines de millisecondes.

D'autres techniques moins conventionnelles ont été développées pour mesurer la diffusion dans les cellules : l'autoradiographie qui consiste à injecter une substance radioactive dans le cytoplasme d'une cellule, à la laisser diffuser et à arrêter les processus de transport en refroidissant brutalement la cellule. La distribution de la radioactivité permet de remonter au coefficient de diffusion de la substance traceuse dans le cytoplasme. Cette technique a été utilisée pour suivre des protéines dans le nerf optique (McEwen & Grafstein, 1968) et du saccharose dans les ovocytes d'amphibiens (Horowitz, 1972). Les temps de diffusion sont ici très long, de l'ordre de l'heure. Enfin, citons la RPE (Résonance Paramagnétique Électronique) où le coefficient de diffusion est directement relié à l'élargissement des raies d'absorption (Keith *et al.*, 1977). La mesure est instantanée, ce qui correspond donc à des temps de diffusion très courts. Cette technique a été utilisée pour mesurer la diffusion d'une molécule paramagnétique dans plusieurs cellules de mammifères (Mastro *et al.*, 1984).

Ces différentes méthodes ont en commun d'utiliser des molécules exogènes et/ou de nécessiter un marquage. De ce fait, les molécules peuvent ne pas être représentatives des transports effectivement présents dans les cellules. De plus ces techniques ne permettent pas de faire des mesures sur le cerveau entier.

Au contraire, les techniques de diffusion par résonance magnétique nucléaire permettent de sonder le mouvement de molécules endogènes *in vivo* à l'échelle d'un organe. La diffusion de l'eau en particulier a été et reste beaucoup étudiée. Cependant, l'eau n'est pas spécifique à un compartiment. Elle est présente partout dans les tissus biologiques. Pour avoir une information plus spécifique de la diffusion intracellulaire, il est possible de mesurer la diffusion de métabolites intracellulaires (Nicolay *et al.*, 2001).

La partie qui suit décrit le principe des mesures de diffusion en RMN : spectroscopie par résonance magnétique (SRM) ou imagerie par résonance magnétique (IRM) de diffusion.

5.2 Principe de la mesure de diffusion en RMN

La mesure de diffusion en RMN réside dans l'application de gradients qui vont successivement déphaser puis rephaser les spins en fonction de leur position. La phase acquise dépendant linéairement de la position, si un spin change de position pendant la mesure, le rephasage n'est pas total. On observe alors une atténuation du signal qui est directement reliée au coefficient de diffusion ADC.

D'une manière générale, les gradients sont utilisés en RMN pour modifier localement le champ magnétique. Considérons un gradient d'amplitude $g(t)$ appliqué selon la direction x pendant une durée δ . Un spin situé en un point x de l'espace, voit un champ magnétique $g(t)x(t)$ et acquiert une phase qui dépend de sa position. L'expression générale de cette phase est donnée par l'expression (5.1) :

$$\Phi = \gamma \int_0^\delta g(t)x(t)dt \quad (5.1)$$

Dans le cas général, la forme des gradients $g(t)$ dépend du temps. Dans cette partie, nous présentons deux types de gradients : les gradients bipolaires, qui sont les plus utilisés en pratique, et les gradients oscillants, qui permettent d'obtenir des temps de mesure (temps de diffusion) plus courts. Ces derniers ont été intégrés dans une séquence de spectroscopie LASER pour l'étude de la diffusion anormale dans le cerveau (chapitre 6).

5.2.1 Mesure de diffusion par application de gradients bipolaires

Pour mesurer la diffusion en RMN, la méthode la plus simple est d'intégrer des gradients bipolaires dans une séquence de spectroscopie. Un exemple de séquence est présenté dans la figure II.5.1: elle consiste en une impulsion excitation suivie de deux gradients de polarités différentes.

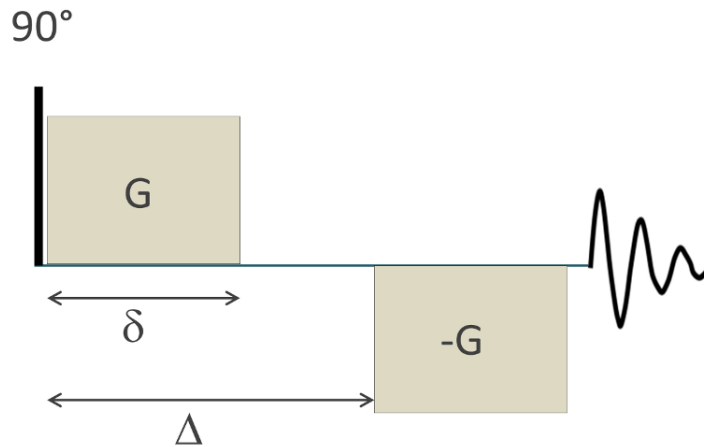


FIGURE II.5.1 – Séquence de spectroscopie de diffusion.

Les gradients ont des amplitudes fixes (+G et -G respectivement) et sont appliqués dans la direction x pendant une durée δ . Pour les calculs, on considèrera que cette durée est suffisamment courte pour qu'on puisse négliger le déplacement des spins pendant l'application des gradients de diffusion.

Après l'excitation, les spins sont soumis à un gradient d'amplitude G pendant une durée δ . La phase d'un spin situé initialement en x_i est $\Phi_i = \gamma G x_i \delta$.

Les spins évoluent librement pendant l'intervalle de temps Δ (appelé temps de diffusion et

noté t_{diff}). Juste avant l'application du second gradient, le spin initialement en x_i se trouve dans sa position finale x_f .

Le déphasage induit par le gradient $-G$ est maintenant $\Phi_f = -\gamma G x_f \delta$

Au total, la phase d'un spin s'étant déplacé de x_i à x_f est $\Phi = \Phi_f + \Phi_i = \gamma G (x_i - x_f) \delta$. Immédiatement, on remarque que si un spin n'a globalement pas bougé ($x_i = x_f$), sa phase est nulle (phase cohérente). Pour les autres, la phase est proportionnelle à leur déplacement.

En RMN, il n'est pas possible de faire des mesures sur un spin individuel. Le signal enregistré correspond à la somme des signaux d'un système de spins. Dans le cas discret d'un système contenant N spins, le signal RMN total S s'écrit :

$$\frac{S}{S_0} = \frac{1}{N} \sum_{p=1}^N \exp(i\Phi_p) \quad (5.2)$$

Avec S_0 le signal sans pondération en diffusion ($G=0$).

Le passage au continu donne la formule (5.3) :

$$\frac{S}{S_0} = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \exp(i\gamma G (x_i - x_f) \delta) P(x_f/x_i, \Delta) dx_i dx_f \quad (5.3)$$

En utilisant la loi de probabilité gaussienne donnée par l'équation (4.6), l'expression (5.3) se simplifie et donne une atténuation du signal en exponentielle décroissante :

$$\frac{S}{S_0} = \exp(-\gamma^2 G^2 \delta^2 \Delta D) \quad (5.4)$$

Finalement, en posant $b = \gamma^2 G^2 \delta^2 \Delta$, le facteur de pondération en diffusion, on obtient la formule utilisée en pratique en spectroscopie de diffusion :

$$\frac{S}{S_0} = \exp(-bD) \quad \text{soit} \quad D = -\frac{1}{b} \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) \quad (5.5)$$

Ce résultat est généralement étendu quand la diffusion n'est plus libre en remplaçant D par le coefficient de diffusion effectif, $ADC = \frac{\langle x^2 \rangle}{2t}$. Pendant ma thèse, nous avons vérifié la validité de cette approximation lors de simulations numériques de diffusion dans des milieux restreints et tortueux.

La formule (5.5), obtenue dans le cas des gradients bipolaires, s'applique en réalité à toutes les séquences de diffusion en utilisant l'expression générale de l'atténuation du signal :

$$\frac{S}{S_0} = \exp \left(- \int_0^{TE} k(t) D(t) k(t) dt \right) \quad (5.6)$$

avec k le moment du gradient de diffusion tel que

$$k(t) = \gamma \int_0^t G(t') dt' \quad (5.7)$$

Le facteur de pondération b s'écrit alors :

$$b = \int_0^{\text{TE}} k(t)^2 dt \quad (5.8)$$

En utilisant la formule généralisée de l'atténuation du signal 5.6, l'expression du facteur de pondération en diffusion pour les gradients bipolaires devient :

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \quad (5.9)$$

Dans cette expression, la diffusion n'est plus négligée pendant la durée des gradients. Le temps de diffusion t_{diff} corrigé est $\Delta - \frac{\delta}{3}$. Il correspond à ce que l'on a appelé temps de mesure dans la partie 4.2.

Finalement, quelle que soit la séquence de diffusion, on peut obtenir le coefficient de diffusion ADC par régression linéaire en traçant $\ln\left(\frac{S}{S_0}\right)$ en fonction de b .

Dans le cas de gradients bipolaires, pour faire varier b , plusieurs options s'offrent à nous : faire varier les temps δ et Δ ou l'amplitude des gradients G . La variation de l'un ou l'autre des temps caractéristiques de la séquence entraîne une modification du temps d'écho TE et provoque donc des différences au niveau de la relaxation T_2 et de la J-modulation. C'est la raison pour laquelle, en général et quand cela est possible, on fait uniquement varier G .

Il faut remarquer que l'atténuation du signal RMN n'est mono-exponentielle que pour les faibles valeurs de b (inférieures à 5000 s/mm^2) (Assaf & Cohen, 1998). En spectroscopie RMN de diffusion, à l'exception de rares études (Pfeuffer *et al.*, 2000), on n'utilise pas de valeurs aussi élevées de b et les mesures d'ADC sont obtenues par régression linéaire (Dreher *et al.* (2001), Ellegood *et al.* (2005), Ronen *et al.* (2013)...).

5.2.2 Mesure de diffusion à temps de diffusion courts

Dans le cas très spécifique où on s'intéresse au milieu intracellulaire et à la transition d'un régime de diffusion libre à la diffusion encombrée, les temps de diffusion doivent être réduits, idéalement en dessous de la milliseconde. En effet, dans ce cas, la distance parcourue par les molécules dans un fluide de coefficient de diffusion libre $0.8 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{ms}$ est de l'ordre de la distance inter-obstacle. Pour réduire au maximum le temps de diffusion avec les gradients bipolaires, il faut prendre Δ le plus court possible, soit $\Delta = \delta$. Dans ce cas, le temps de diffusion est égal à $\frac{2}{3}\delta$. Cependant pour avoir une durée de gradient de l'ordre de la

milliseconde, on est confronté à la limitation sur le temps de montée des gradients de $250 \mu\text{s}$.

Pour parer à ce problème, l'utilisation de gradients oscillants, qui réduisent la demande en amplitude des gradients, est préférée. Le passage des gradients bipolaires aux gradients oscillants permet une montée plus douce des gradients. Cela se voit aisément sur la figure II.5.2, où le gradient oscillant le plus simple est présenté.

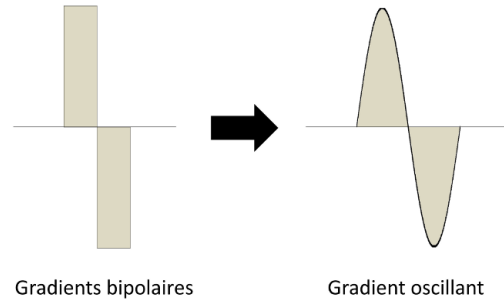


FIGURE II.5.2 – Passage des gradients bipolaires aux gradients oscillants.

En pratique, ce gradient oscillant est rarement utilisé en l'état. Le motif de base du gradient est répété de telle sorte que les spins sont continuellement déphasés puis rephasés pendant la durée totale du gradient T_p . Cela permet de rallonger la durée du gradient et donc d'augmenter la pondération en diffusion tout en conservant le temps de diffusion constant. Par la suite, on note N le nombre de périodes du gradient oscillant, T_p sa durée et G son amplitude maximale.

Les différents types de gradients oscillants

Plusieurs formes de gradients oscillants ont été proposées dans la littérature : le gradient à modulation sinusoïdale, le gradient à modulation double-sinusoïdale et le gradient à modulation cosinusoidale (figure II.5.3).

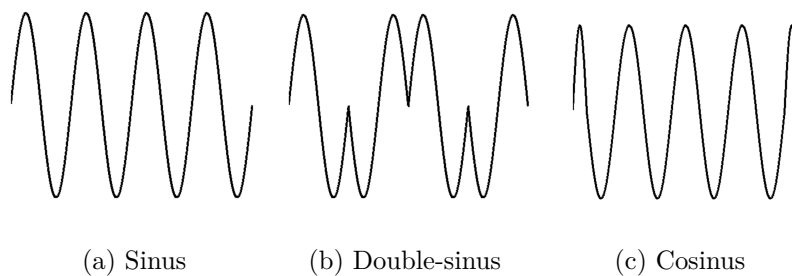


FIGURE II.5.3 – Gradients oscillants générés pour $N=4$.

Les équations permettant de générer les différentes formes de gradients sont données ci-dessous. Pour chacune des formes, G_{max} correspond à l'amplitude maximale du gradient.

Gradient à modulation sinusoïdale

$$g(t) = G_{\max} \sin \left(\frac{2\pi N}{T_p} t \right) \quad (5.10)$$

Gradient à modulation double-sinusoïdale

$$g(t) = G_{\max} \sin \left(\frac{2\pi N}{T_p} t \right) \operatorname{sign} \left(\sin \left(\frac{\pi N}{T_p} t \right) \right) \quad (5.11)$$

Gradient à modulation cosinusoidale

La montée des gradients ne pouvant pas être infinie, le gradient cosinus est apodisé par l'introduction d'un lobe sinusoïdal de période $T_p/2$ au début et à la fin du gradient.

$$g(t) = \begin{cases} G_{\max} \sin \left(\frac{4\pi N}{T_p} t \right) & 0 \leq t < \frac{T_p}{4N} \\ G_{\max} \cos \left(\frac{2\pi N}{T_p} t \right) & \frac{T_p}{4N} \leq t < T_p - \frac{T_p}{4N} \\ -G_{\max} \sin \left(\frac{4\pi N}{T_p} t \right) & T_p - \frac{T_p}{4N} \leq t \leq T_p \end{cases} \quad (5.12)$$

Facteur de pondération b

Pour chaque gradient, le facteur de pondération b est calculé en utilisant la formule (5.8):

Pour les formes sinusoïdales et double-sinusoïdales, on obtient :

$$b = \frac{3}{8} \left(\frac{\gamma G}{\pi N} \right)^2 T_p^3 \quad (5.13)$$

Pour la forme cosinusoidale :

$$b = \frac{1}{8} \left(\frac{\gamma G}{\pi N} \right)^2 T_p^3 \left(1 - \frac{1}{8N} \right) \quad (5.14)$$

Tous paramètres égaux, on constate que la pondération en diffusion des gradients cosinusoidaux est plus faible que celle des deux autres formes, ce qui peut être critique pour la précision des mesures.

Temps de diffusion

Concernant les temps de diffusion des différents gradients oscillants, on se ramène à une expression de la forme $b = \gamma^2 G^2 \delta^2 t_{diff}$, initialement introduite pour les gradients bipolaires (5.9).

Pour les formes sinusoïdales et double-sinusoïdales, le facteur b étant le même, on obtient le

même temps de diffusion :

$$t_{diff} = \frac{3}{8} \frac{T_p}{N} \quad (5.15)$$

Et pour la forme cosinusoidale :

$$t_{diff} = \frac{1}{4} \frac{T_p}{N} \quad (5.16)$$

Pour diminuer le temps de diffusion, il faut augmenter le nombre de périodes N (i.e. augmenter la fréquence du gradient).

Notons que pour une durée et un nombre de périodes identiques, les temps de diffusion des gradients à modulation cosinusoidaux sont plus courts que les sinusoidaux.

Les temps de diffusion définis pour les gradients oscillants sont des ordres de grandeur qui permettent de les comparer aux gradients bipolaires mais leur intérêt réside principalement dans leur spécificité fréquentielle.

Description fréquentielle

De même que l'ADC dépend du temps de diffusion pour les mesures *in vivo*, l'ADC dépend de la fréquence du spectre de diffusion (voir description fréquentielle de la diffusion anormale dans le chapitre 4). En RMN, on peut donc travailler indifféremment dans le domaine temporel ou le domaine fréquentiel.

L'atténuation du signal pondéré en diffusion dans le domaine fréquentiel est déduite de la formule de l'atténuation dans le domaine temporel (équation (5.6)) via le théorème de Parseval :

$$\frac{S}{S_0} = -\frac{1}{\pi} \exp \left(\int_0^\infty F(\omega) D(\omega) F(-\omega) d\omega \right) \quad (5.17)$$

avec $D(\omega)$ le spectre de diffusion défini dans le chapitre 4 comme la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation des vitesses FAV et $F(\omega)$ le spectre de modulation défini comme la transformée de Fourier de l'intégrale sur le temps de $g(t)$:

$$F(\omega) = \gamma \int_{-\infty}^\infty \exp(i\omega t) dt \int_0^t g(t') dt' \quad (5.18)$$

La figure II.5.4 présente les spectres de modulations des trois formes de gradients oscillants pour les paramètres $T_p=120$ ms et $N=20$.

Les spectres de modulation des gradients oscillants infinis sont constitués de diracs à la fréquence du gradient $\pm\omega_{ech}$ (appelée fréquence d'échantillonnage) et d'un dirac supplémentaire à la fréquence nulle si l'intégrale du gradient effectif est non nulle (cas du gradient sinusoidal).

Or, comme les gradients ne sont pas infinis, les diracs sont convolués à des sinus cardinaux dont la largeur est inversement proportionnelle à la durée du gradient.

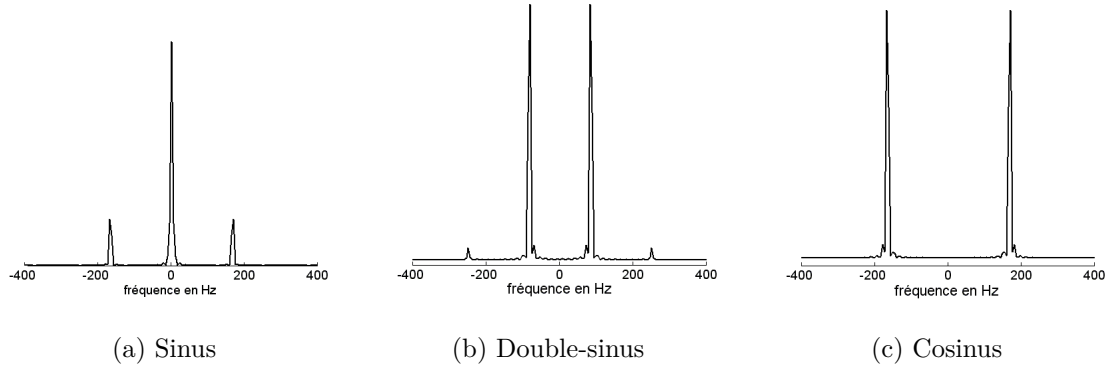


FIGURE II.5.4 – Spectres de modulation pour les trois formes de gradients oscillants avec $T_p=120$ ms et $N=20$.

Les gradients oscillants ont donc des spectres de modulation très sélectifs en fréquence et permettent de mesurer l'ADC à des fréquences très précises.

Pour les gradients oscillants, les spectres de modulation $F(\omega)$ ont été calculés dans le cas idéal de gradients infinis (Does *et al.*, 2003). En remplaçant les expressions de $F(\omega)$ dans l'équation (5.17), on trouve les valeurs d'ADC pour les différents gradients :

- $\text{ADC} = \frac{2}{3}D(0) + \frac{1}{3}D(\omega_d)$ pour le gradient sinusoïdal
- $\text{ADC} \sim D(\frac{\omega_d}{2})$ pour le gradient double-sinusoïdal
- $\text{ADC} = D(\omega_d)$ pour le gradient cosinusoïdal

avec $\omega_d = N/T_p$.

Parmi les trois gradients oscillants présentés, seul le gradient sinusoïdal a une intégrale non nulle et ne permettra donc pas un échantillonnage à une fréquence pure.

Caractérisation de la diffusion anormale dans les cellules du cerveau

6.1 Introduction

La biologie cellulaire est gouvernée par le transport de métabolites, macromolécules et organelles de leur site de synthèse à leur site d'utilisation puis leur site de dégradation. Le déplacement dans le cytoplasme est donc un processus important et potentiellement limitant dans la vitesse de réactions chimiques et biologiques à l'intérieur des cellules. Cela est particulièrement le cas dans les neurones où les distances à parcourir sont extrêmement grandes.

Pour étudier le transport de molécules intracellulaires, de nombreuses techniques ont été développées (voir chapitre 5). Parmi elles des méthodes optiques (FCS, FRAP, SPT), l'autoradiographie, la résonance paramagnétique électronique (ESR) et bien sur les techniques de diffusion par résonance magnétique (IRM et SRM). Toutes ces techniques donnent une estimation du déplacement quadratique moyen $\langle x^2 \rangle$ selon un axe ou du coefficient de diffusion apparent $ADC \sim \langle x^2 \rangle / t_{diff}$ (avec t_{diff} le temps de mesure).

Le coefficient de diffusion apparent des molécules dépend de nombreux paramètres, la restriction, l'encombrement intracellulaire, la viscosité du cytoplasme et la présence ou non de transport actif. L'importance relative de ces différents paramètres reste à l'heure actuelle inconnue. L'observation de l'évolution de $\langle x^2 \rangle$ en fonction du temps de mesure permet de lever la sous-détermination du problème et donc d'obtenir une identification et une quantification indépendante des différents paramètres. Dans le cas de la diffusion libre, $\langle x^2 \rangle$ varie linéairement avec t_{diff} . Toute déviation par rapport à ce comportement est référencée par le terme "diffusion anormale". Si $\langle x^2 \rangle$ croît plus vite que dans la diffusion libre, on parle de superdiffusion (cas du transport actif), sinon, on parle de subdiffusion (cas de la diffusion encombrée).

Des mesures de diffusion anormale de molécules exogènes et inertes dans les cellules de cerveau ont été réalisées en utilisant des techniques optiques ou de fluorescence (Santamaria *et al.* (2006), Malchus & Weiss (2010)). Toujours dans le cerveau, la diffusion anormale de l'eau endogène a été mise en évidence grâce à l'IRM de diffusion (Does *et al.*, 2003). Aucune de ces études n'a permis d'identifier de transport actif dans le cerveau. Toutefois, ces observations ne concernent que des molécules exogènes ou non spécifiques qui peuvent ne pas être impliquées dans le transport actif. Il est possible que ce type de transport existe pour les molécules endogènes du cerveau.

Parmi les techniques de mesure de diffusion à notre disposition, la spectroscopie RMN de diffusion est la seule à permettre l'étude de la diffusion anormale de molécules endogènes, spécifiques du compartiment intracellulaire, à l'échelle d'un organe. A notre connaissance, la seule étude de diffusion anormale utilisant cette technique a été menée dans le muscle en phosphore 31 (de Graaf *et al.*, 2000).

L'étude de la diffusion anormale dans le cerveau n'ayant pas été réalisée jusqu'à présent, l'interprétation des variations d'ADC en spectroscopie RMN de diffusion reste hypothétique. Ainsi, les courants cytoplasmiques, dont l'existence dans les cellules du cerveau est discutée, sont souvent invoqués pour expliquer des baisses ou des augmentations d'ADC. Une diminution de ces courants permet d'expliquer la baisse d'ADC observée dans les cas d'ischémie chez le rat (Wick *et al.* (1995), Dreher *et al.* (2001), van der Toorn *et al.* (1996), Dijkhuizen *et al.* (1999)) mais aussi chez l'homme (Harada *et al.*, 2002). Symétriquement une augmentation des courants cytoplasmiques est une hypothèse pour l'augmentation de l'ADC des métabolites lors d'une stimulation visuelle chez l'homme (Branzoli *et al.*, 2013).

L'importance des courants cytoplasmiques est supportée par des valeurs d'ADC très proches pour des métabolites n'évoluant pourtant pas dans le même environnement, ou évoluant dans le même environnement mais avec des coefficients de diffusion libre différents. Le transport se ferait selon un mécanisme identique pour tous les métabolites et donc conduirait à une uniformisation des ADC quel que soit le compartiment ou la molécule considérée (Nicolay *et al.*, 2001). De plus, des courants cytoplasmiques ont déjà été observés chez les mammifères : dans les cellules cancéreuses du poumon chez l'homme (Sherwin *et al.*, 1967) et dans les ovocytes de souris (Yi *et al.*, 2011). Dès lors rien n'interdit leur existence dans le cerveau.

Une première tentative pour lever l'indétermination sur la mesure d'ADC a été de rassembler les données de la littérature réalisées en spectroscopie RMN de diffusion à différents temps de diffusion dans le cerveau de mammifères et d'observer la dépendance de l'ADC au temps de diffusion (figure II.6.1).

La dépendance n'est pas évidente. Il est possible que les temps de diffusion soient trop long (au minimum 11.70 ms) pour voir la transition entre la diffusion libre et la diffusion anormale. Et même si l'on peut imaginer une petite augmentation de l'ADC quand le temps

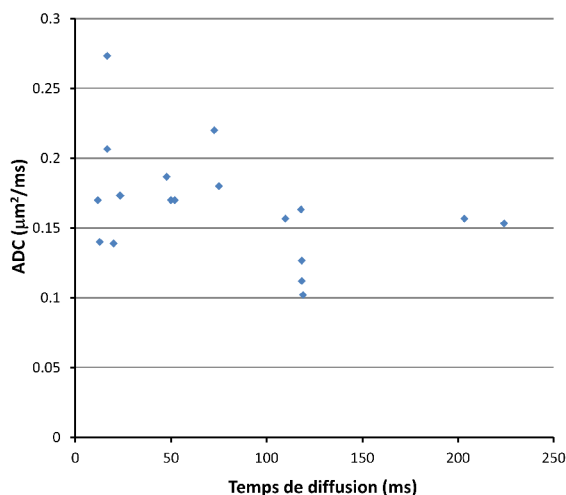


FIGURE II.6.1 – Récapitulatifs des mesures d'ADC moyennées sur NAA, tCr, tCho trouvées dans la littérature en fonction du temps de diffusion. Dans l'ordre des temps de diffusion croissants : Dreher *et al.* (2001), Merboldt *et al.* (1993), Wick *et al.* (1995), de Graaf *et al.* (2001), Dijkhuizen *et al.* (1999), van der Toorn *et al.* (1996), Harada *et al.* (2002), Kan *et al.* (2011), Abe *et al.* (2000), Ellegood *et al.* (2011), Hakumaki *et al.* (1998), Ellegood *et al.* (2005), Valette *et al.* (2005), Valette *et al.* (2007), Pfeuffer *et al.* (2000), Ellegood *et al.* (2006), Posse *et al.* (1993), Branzoli *et al.* (2013).

de diffusion diminue, ce qui correspondrait à un phénomène de subdiffusion, les données sont trop bruitées pour conclure. Enfin, les mesures n'ont pas été faites dans les mêmes conditions (animaux différents, séquences différentes...).

Pour caractériser la diffusion anormale dans le cerveau de rat et évaluer l'importance des différents paramètres impliqués dans le mouvement des métabolites, nous avons développé une séquence de spectroscopie RMN de diffusion originale permettant d'atteindre des temps de diffusion allant de 0.9 à 13 ms et ainsi de tenter d'échantillonner la zone de transition de la diffusion libre à la diffusion anormale.

6.2 Développement d'une séquence de diffusion à très courts temps de diffusion

6.2.1 Séquence LASER

La séquence que nous avons développée est construite à partir d'une séquence de spectroscopie LASER (Localization by Adiabatic SElective Refocusing) qui a été initialement décrite par Garwood (Garwood & DelaBarre, 2001).

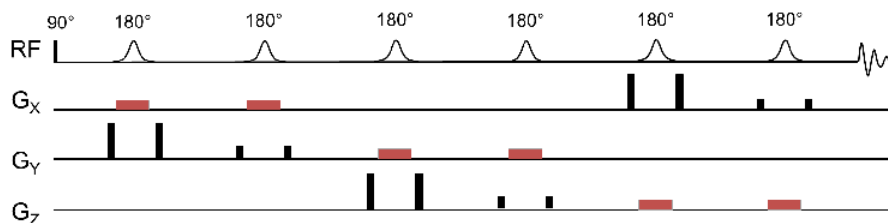


FIGURE II.6.2 – Séquence LASER.

Elle est constituée d'une impulsion adiabatique d'excitation suivie de trois blocs orthogonaux

qui sélectionnent chacun un plan. Le signal provient d'un voxel qui correspond à l'intersection des trois plans orthogonaux.

Chaque bloc est composé d'une paire d'impulsions adiabatiques d'inversion. La première impulsion sélectionne un plan, la deuxième refocalise la dispersion non linéaire de la phase induite par la première impulsion. Des gradients, appelés spoilers, en noir sur la figure II.6.2, détruisent l'aimantation résiduelle à l'extérieur du volume d'intérêt.

Cette séquence permet une bonne localisation car les profils des impulsions adiabatiques sont très nets. Le signal est aussi maximisé par l'utilisation d'un train d'impulsions 180° (train de Carr-Purcell) qui diminue les temps de relaxation T_2 et rephase en partie les spins J-couplés.

La séquence LASER a été optimisée lors de ce travail. Les impulsions utilisées pour l'inversion sont des impulsions adiabatiques d'inversion d'ordre 4 et de rapport bande passante-temps $R=20$. Leur durée est fixée à 2 ms. Les gradients de spoilers autour de chaque impulsion d'inversion durent quant à eux 1 ms. Finalement, le bloc de localisation dure 27 ms (sans compter les délais nécessaires pour éviter les problèmes de courants de Foucault).

6.2.2 Choix des gradients de diffusion

Dans cette étude, l'objectif est de caractériser la diffusion anormale dans les cellules du cerveau, ce qui signifie mesurer la variation de l'ADC en fonction du temps de diffusion (voir chapitre 4).

Dans la littérature, on observe une relative stabilité de l'ADC en fonction du temps de diffusion (figure II.6.1). Les temps de diffusion utilisés dans les précédentes études sont sans doute trop longs et l'on mesure le plateau succédant à la diffusion anormale (voir figure II.6.3). La plus basse valeur de temps de diffusion utilisée dans la littérature est de

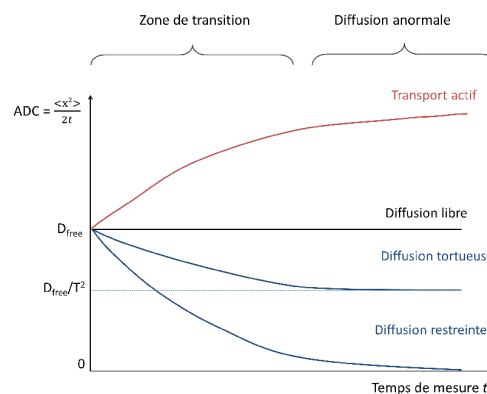


FIGURE II.6.3 – Définition des différentes zones.

11.70 ms (Dreher *et al.*, 2001). On veut donc acquérir des données à des temps de diffusion plus bas pour observer la transition entre la diffusion libre et la diffusion anormale (diffusion

encombrée ou transport actif). Dans ce travail, nous nous sommes aussi fixés comme objectif d'atteindre un temps de diffusion inférieur à la milliseconde pour que la distance parcourue par les métabolites soit de l'ordre de la distance inter-obstacle (environ $1 \mu\text{m}$).

Pour cela, notre choix se porte sur les gradients oscillants qui permettent d'atteindre des temps de diffusion plus courts que des gradients bipolaires.

Comme présenté dans le chapitre 5, pour avoir une vision rigoureuse des gradients oscillants, il est nécessaire de passer dans le domaine fréquentiel. Dans ce domaine, la caractérisation de la diffusion anormale revient à étudier la variation de l'ADC en fonction de la fréquence. Concrètement, on cherche à échantillonner le spectre de diffusion à des fréquences précises dans la zone de transition (principe de la mesure sur la figure II.6.4). En ne regardant que les fréquences positives, si D augmente avec la fréquence d'échantillonnage ω_{ech} , le transport prédominant est la diffusion encombrée, sinon, c'est le transport actif. La fréquence maximale devra correspondre à un temps de diffusion inférieur à 1 ms.

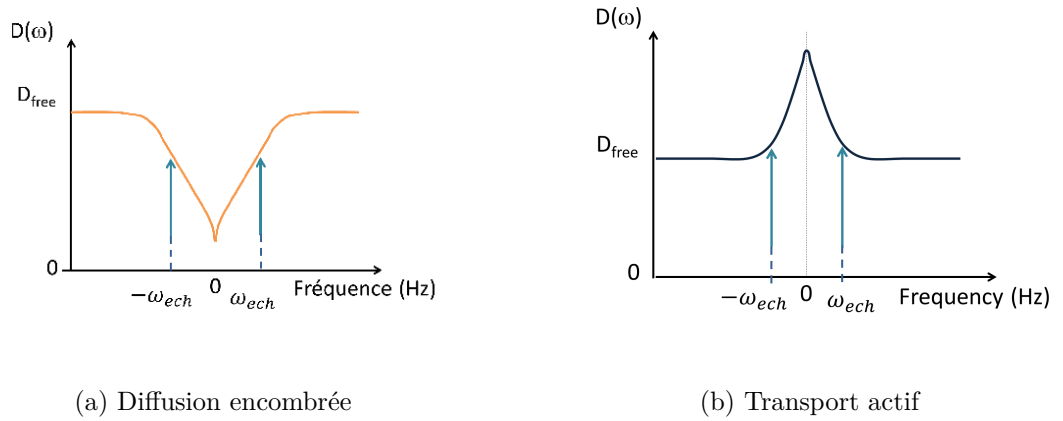


FIGURE II.6.4 – Échantillonnage du spectre de diffusion à la fréquence de diffusion ω_{ech} .

Pour réaliser l'échantillonnage, plusieurs gradients sont à notre disposition : le gradient à modulation sinusoïdale, le gradient à modulation double-sinusoïdale et le gradient à modulation cosinusoïdale. Ces 3 gradients ont été caractérisés dans le chapitre 5.

D'un point de vue fréquentiel, le gradient à modulation sinusoïdale se distingue des deux autres. Son spectre de modulation présente un pic à la fréquence zéro dont l'aire est deux fois plus grande que les pics $\pm\omega_d$. On mesure donc conjointement des phénomènes apparaissant à des fréquences différentes :

- En $\omega_d = N/T_p$ (temps de diffusion court), on peut s'approcher de D_{free} quand N augmente
- En zéro ($t_{diff} \rightarrow \infty$), on mesure toujours la restriction.

Ce gradient ne permet pas d'échantillonner le spectre de diffusion à une seule fréquence

(non nulle) et est surtout sensible à la restriction. Il ne permettra pas l'étude de la diffusion anormale car il est impossible de discerner les deux contributions dans la mesure d'ADC. Les deux autres gradients (gradients à modulation double-sinusoidale et cosinusoidale) permettent d'échantillonner le spectre de diffusion à une fréquence précise.

Notons que mis à part les problèmes de commutation rapide de gradients, les gradients bipolaires ne permettraient pas l'échantillonnage du spectre de diffusion à une fréquence précise. En effet, le spectre de modulation d'un gradient bipolaire est un sinus cardinal centré en zéro dont la largeur est inversement proportionnelle à sa durée. La mesure d'ADC est non spécifique et toujours sensible à la restriction.

Dans le choix des gradients de diffusion, on cherche à avoir le temps de diffusion le plus court possible (fréquence d'échantillonnage élevée) et une pondération en diffusion importante pour avoir une bonne précision de mesure.

Du point de vue fréquentiel, le gradient à modulation cosinusoidale présente un avantage sur le gradient double-sinusoidal car sa fréquence d'échantillonnage est deux fois plus grande ($\omega_{ech} = N/T_p$ au lieu de $\omega_{ech} = N/2T_p$). A l'inverse, les gradients à modulation double-sinusoidale permettent d'avoir une pondération en diffusion plus élevée que les gradients à modulation cosinusoidale (environ 3 fois supérieure).

En pratique, l'utilisation de gradients à modulation double-sinusoidale a généré de forts courants de Foucault certainement dus à la commutation trop brutale des gradients. Ce sont donc les gradients à modulation cosinusoidale qui sont retenus pour cette étude.

6.2.3 Design de la séquence finale

Les gradients oscillants sont insérés dans une séquence de localisation LASER. Pour avoir la pondération en diffusion maximum, ils sont appliqués dans les trois directions simultanément.

Afin de respecter la symétrie de la séquence LASER et ainsi bénéficier des avantages des trains d'impulsions de type CPMG, les gradients ont initialement été introduits entre chaque impulsion comme cela est présenté sur la figure II.6.5.

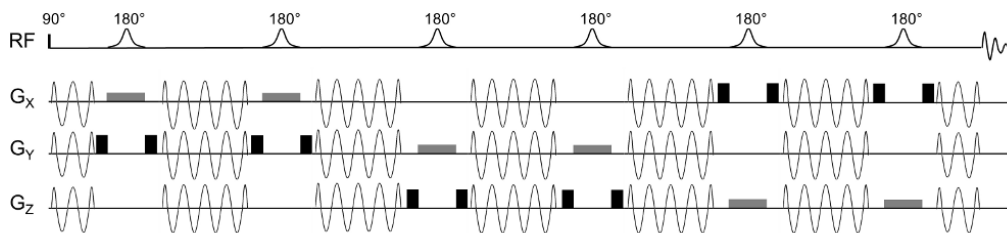


FIGURE II.6.5 – Séquence de spectroscopie LASER symétrique pondérée en diffusion. Les gradients de diffusion sont des gradients cosinusoidaux, les gradients de sélection de coupe sont en rouge et les spoilers sont en noir.

Cependant cette séquence posait un certain nombre de problèmes :

- La séquence de gradients présente une périodicité supplémentaire (en plus de celle des gradients oscillants) ce qui a pour conséquence l'apparition d'un deuxième pic sur le spectre de modulation de la séquence (voir figure II.6.6).
- La fréquence minimale est imposée par le premier gradient de diffusion (juste après le 90°). Pour une durée totale de gradient de 120 ms, la fréquence minimale est de 100 Hz, ce qui correspond à un temps de diffusion de 2.5 ms. Il n'est pas possible de vérifier le raccordement avec les données de la littérature.

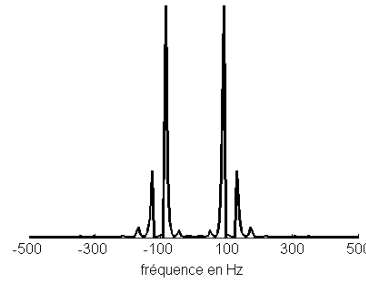


FIGURE II.6.6 – Spectre de modulation de la séquence de gradient LASER symétrique.

Pour pouvoir diminuer la fréquence minimale, les gradients de diffusion ont finalement été insérés de manière asymétrique de part et d'autre de la première impulsion adiabatique d'inversion. La séquence définitive est présentée sur la figure II.6.7.

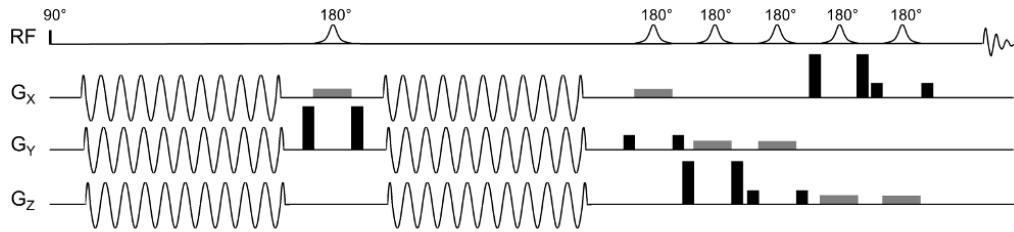


FIGURE II.6.7 – Séquence de spectroscopie LASER asymétrique pondérée en diffusion.

Cette séquence a de plus l'avantage de diminuer le nombre de délais entre les différents gradients et donc de réduire les sources potentielles de courants de Foucault.

6.2.4 Optimisation des différents paramètres

Choix de la pondération en diffusion b

Le choix des gradients à modulation cosinusoidale pour la séquence est critique pour la pondération en diffusion. Parmi les trois gradients oscillants présentés, c'est celui dont le facteur b est le plus faible. Dans cette partie, on cherche à déterminer quelle est la pondération

en diffusion minimale permettant de minimiser les erreurs de mesures. Pour cela, on réalise des simulations de Monte Carlo.

Les simulations comprennent plusieurs étapes :

- Générer des spectres en utilisant une base LCModel (Provencher, 1993) correspondant à la séquence de spectroscopie de diffusion LASER asymétrique
- Appliquer l'atténuation due à la relaxation T_2 ($\exp(-TE/T_2)$) et celle due à la pondération en diffusion ($\exp(-bADC)$). L'influence du couplage J pendant TE est ici négligé.
- Ajouter aux spectres du bruit correspondant au bruit des mesures *in vivo*
- Ajuster les spectres obtenus avec la même base LCModel
- Calculer les ADC des données simulées
- Les comparer avec la valeur réelle de l'ADC

On réalise 50 fois ce module pour des temps d'écho TE allant de 125 à 175 ms et pour des valeurs de b allant de 0 à 2000 s/mm². On prend les valeurs des temps de relaxation T_2 dans la littérature pour le N-Acétylaspartate (NAA), la créatine totale (tCr), les composés choline (tCho) (de Graaf *et al.*, 2006). Les ADC sont pris égaux à 0.15 $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ pour les trois métabolites.

Pour tous les temps d'écho, on regarde l'évolution de l'écart type sur la mesure de l'ADC en fonction de la pondération en diffusion b . Les courbes sont semblables pour les différents temps d'écho. Celles obtenues pour $TE=155$ ms sont représentées sur la figure II.6.8.

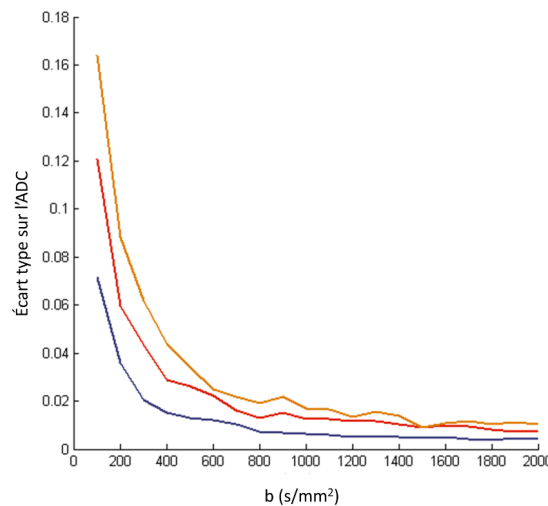


FIGURE II.6.8 – Écart type sur la mesure d'ADC pour les métabolites NAA (bleu), Choline totale (jaune) et la Créatine totale (rouge) déterminé par un algorithme de Monte Carlo (50 tirages).

On constate que l'erreur sur les mesures d'ADC devient stable et inférieure à 0.02 $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ à partir de $b=1000$ s/mm². Cela correspond à une erreur inférieure à 13%. C'est donc la valeur que nous retiendrons comme pondération en diffusion.

Choix des paramètres des gradients

Dans ce travail, l'objectif est d'atteindre des temps de diffusion inférieurs à 1 ms. Pour trouver le gradient permettant de répondre à cette condition, on utilise l'expression de b pour les gradients à modulation cosinusoidale :

$$b = \frac{1}{8} \left(\frac{\gamma G}{\pi N} \right)^2 T_p^3 \left(1 - \frac{1}{8N} \right) \quad (6.1)$$

Dans cette formule, l'amplitude des gradients est prise égale à 80% de l'amplitude maximale disponible dans l'aimant, soit $G=480$ mT/m, b est fixé à 1000 s/mm². La durée des gradients T_p et le nombre de périodes N sont des paramètres variables.

Finalement, la durée minimale des gradients, telle que le temps de diffusion minimal soit inférieur à 1 ms, est 60 ms. Dans ce cas, Le nombre maximal de périodes N est 16 et le temps de diffusion est 0.94 ms.

Pour échantillonner le spectre de diffusion à des fréquences bien réparties, on génère 6 gradients d'une durée de 60 ms pour $N=1,5,8,10,12,16$. Les spectres de modulation des gradients insérés dans la séquence finale sont représentés sur la figure II.6.9.

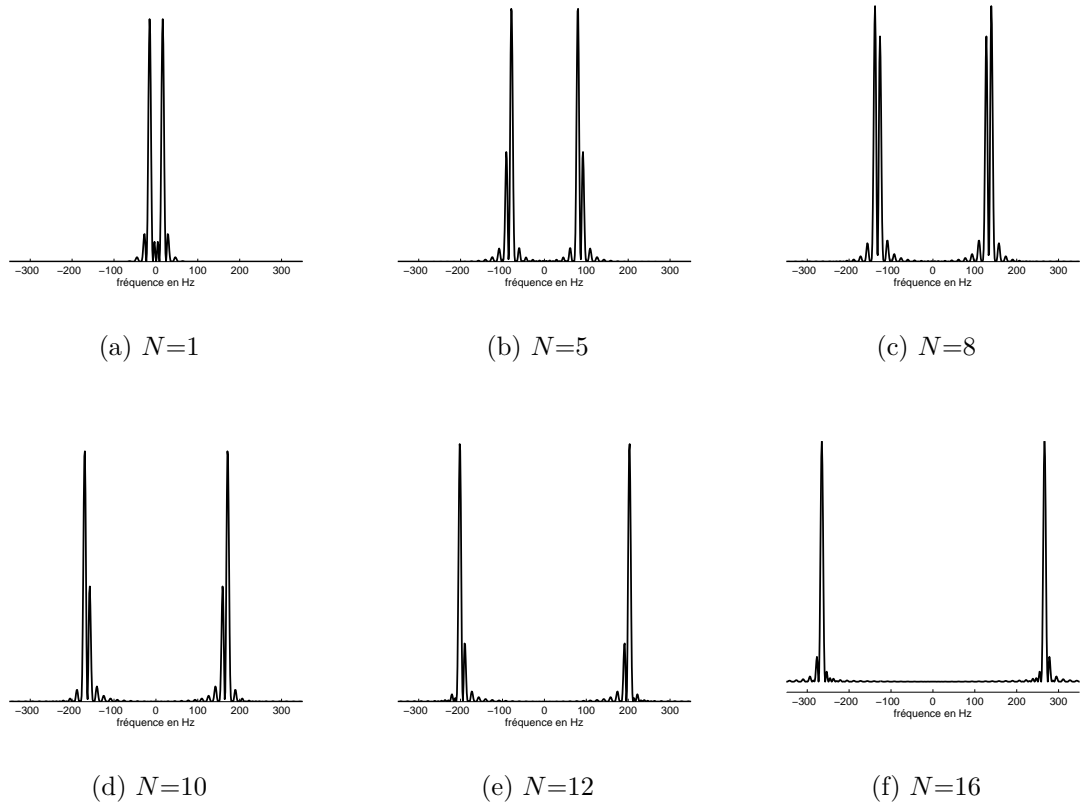


FIGURE II.6.9 – Spectres de modulation des gradients à modulation cosinusoidale utilisés pour les expériences *in vivo* ($T=60$ ms).

Les spectres de modulation des différentes séquences de gradients ne sont pas aussi parfaits que ceux présentés dans la partie théorique (chapitre 5, figure II.5.4). La fréquence d'échantillonnage ne peut pas être calculée avec la formule théorique $\omega_d = N/T$. Elle est prise égale à la moyenne pondérée des fréquences de chacun des spectres. On calcule ensuite le temps de diffusion en utilisant cette nouvelle fréquence $t_{diff} = \frac{1}{4\omega_d}$ (cf équation (5.16)).

En résumé, on a :

- $N=1$, $\omega_d=19$ Hz, $t_{diff}=12.9$ ms
- $N=5$, $\omega_d=86$ Hz, $t_{diff}=2.9$ ms
- $N=8$, $\omega_d=134$ Hz, $t_{diff}=1.9$ ms
- $N=10$, $\omega_d=169$ Hz, $t_{diff}=1.48$ ms
- $N=12$, $\omega_d=201$ Hz, $t_{diff}=1.24$ ms
- $N=16$, $\omega_d=267$ Hz, $t_{diff}=0.94$ ms

En pratique, le temps d'écho minimal de la séquence LASER asymétrique pondérée en diffusion est TE=154 ms. Ce temps prend en compte les délais nécessaires à la disparition des courants de Foucault.

6.3 Protocole expérimental

Pour cette étude, 20 rats sains ont été utilisés ($m=300-350$ g). Les procédures ont été développées en accord avec les recommandations de l'union européenne (86/609/EEC) pour l'usage des animaux de laboratoire et conformément aux réglementations éthiques du ministère français de l'agriculture et des forêts. Les animaux ont été anesthésiés à l'isoflurane (2%) dans un mélange d'air et d'oxygène (1:1) et positionnés dans un cadre stéréotaxique permettant de limiter les mouvements. Leur température a été maintenue à 37 °C par un système d'air chaud.

La transmission radiofréquence a été réalisée avec une antenne volumique alors que la réception a été obtenue avec une antenne de surface en quadrature équipée d'un découplage actif (RapidBiomed).

Une image haute résolution (2D fast spin echo) a été acquise pour positionner le voxel utilisé dans les expériences de spectroscopie. Ce voxel de 450 μL comprend une large fraction du cerveau (figure II.6.10).

Les paramètres de la séquence de spectroscopie de diffusion sont un temps d'écho de 154 ms et un temps de répétition de 2 s.

Pour chaque fréquence de diffusion (i.e. chaque gradient de diffusion), les spectres des métabolites ont été acquis en 128 répétitions pour $b=0$ et $b=1000$ s/mm². Pour la correction des courants de Foucault, un spectre de l'eau a aussi été acquis pour chaque condition expérimentale.

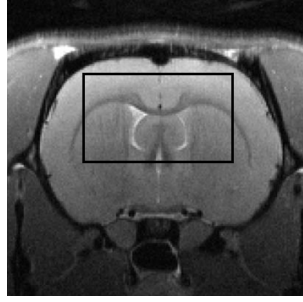


FIGURE II.6.10 – Positionnement du voxel $5 \times 8 \times 9 \text{ mm}^3$ dans le cerveau d'un rat sur une image pondérée T_1 .

Les spectres ont ensuite été traités sous Matlab. Pour une fréquence de diffusion, aucune variation de phase due à un mouvement macroscopique de l'animal n'a été observée sur les spectres de l'eau et sur ceux des métabolites. Les spectres individuels ont donc été sommés sans rephasage individuel. Les spectres sommés ont été corrigés des courants de Foucault en utilisant les spectres de l'eau (Klose, 1990).

Les spectres ont finalement été analysés avec LCModel en utilisant une base générée avec les paramètres de notre séquence. Notons qu'au temps d'écho utilisé, le signal des macromolécules et des composés lipidiques ne contaminent pas les spectres. Les métabolites dont les Cramér-Rao lower bounds sont inférieurs à 10% sont retenus. Ici, seuls le NAA (N-acétylaspartame), la créatine totale tCr (i.e. créatine et phosphocréatine) et les composés choline tCho (essentiellement, la phosphocholine et glycerophosphocholine) sont quantifiés.

6.4 Résultats

6.4.1 Validation de l'utilisation d'un seul b

L'utilisation de la formule $\text{ADC} = -\frac{1}{b} \ln \left(\frac{S}{S_0} \right)$ suppose que l'atténuation du signal RMN est mono-exponentielle pour la valeur de b utilisée. Pour vérifier la validité de cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de diffusion en variant la valeur de la pondération en diffusion b .

En pratique, il n'est pas possible d'atteindre une pondération en diffusion supérieure à 1000 s/mm^2 pour les gradients dont la fréquence est la plus élevée. Or la déviation de la linéarité est d'autant plus critique que la diffusion est contrainte. En effet, en présence de restriction, la distribution de phase ne peut plus être décrite par une distribution gaussienne. On peut donc se contenter de vérifier la linéarité pour les gradients ayant les plus longs temps de diffusion.

On choisit de réaliser des expériences sur 2 rats pour $N=1, 5$ et 8 et pour des valeurs de b allant de 0 à 5000 s/mm^2 . Les résultats obtenus pour les trois gradients sont similaires. On présente ceux obtenus pour $N=8$ sur la figure II.6.11.

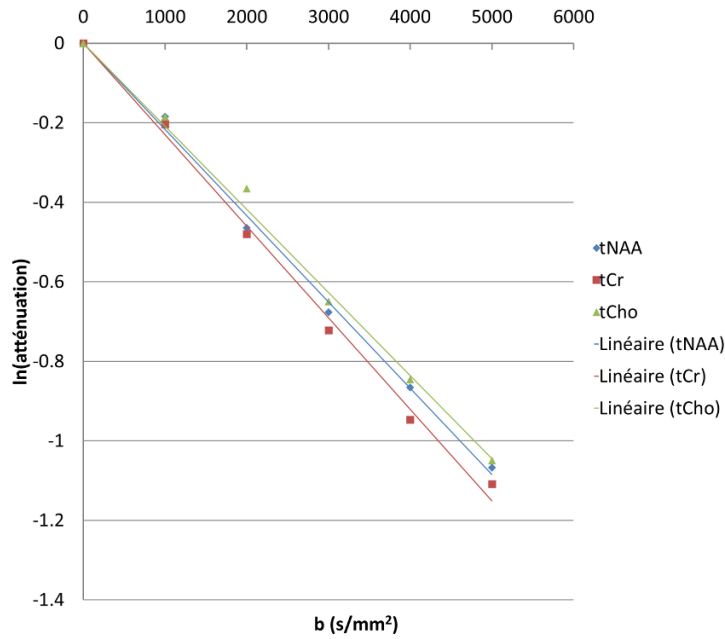


FIGURE II.6.11 – Vérification de l'hypothèse de l'atténuation mono-exponentielle du signal RMN pour b allant de 0 à 5000 s/mm² ($N=8$). Les coefficients de régression linéaire R^2 sont 99.6% pour le NAA, 99.5% pour tCr et 99.5% pour tCho.

Pour les gradients $N=1$, $N=5$ et $N=8$, les coefficients de régression linéaires sont aussi supérieurs à 99% pour tous les métabolites.

Finalement, ces expériences permettent de justifier l'utilisation du seul facteur de pondération $b=1000$ s/mm².

6.4.2 Expériences sur fantôme

Avant de réaliser les expériences *in vivo*, un dernier contrôle a été nécessaire : vérifier dans un fantôme sans restriction, la stabilité de l'ADC quel que soit le gradient de diffusion utilisé (i.e. le temps de diffusion considéré).

Pour cette expérience, un fantôme de NAA (sérum physiologique, 40mM) a été utilisé. Les paramètres de séquence restent identiques à ceux des expériences *in vivo* (partie 6.3). La figure II.6.12 représente la moyenne des six expériences réalisées.

On constate que les ADC de l'eau et du NAA mesurés sur fantôme sont très stables. Leurs variations aux différents temps de diffusion sont inférieures à 2% pour l'eau et 10% pour le NAA.

Néanmoins, on constate qu'il existe un artefact à la fréquence 170 Hz. Il peut être dû à un appareil électronique situé à proximité ou à un mode de vibration du fantôme liquide. Pour la suite, on ne prendra pas en compte cet artefact qui n'est apparu que dans les expériences *in vitro* (voir figures II.6.14 et II.6.15).

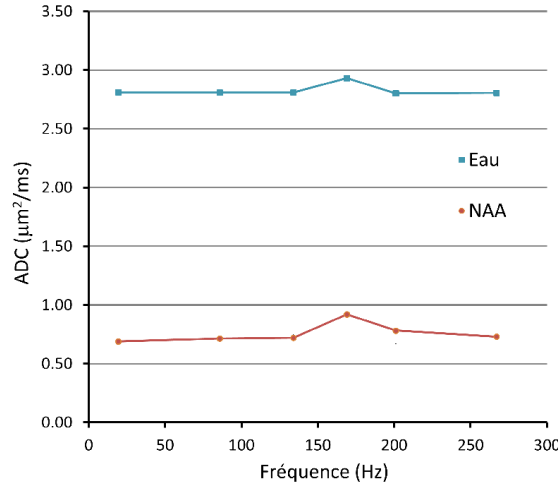


FIGURE II.6.12 – Variation de l'ADC de l'eau et du NAA dans un fantôme liquide.

6.4.3 Expériences *in vivo*

Une fois tous les contrôles réalisés, les expériences *in vivo* ont été réalisées sur 20 rats sains en suivant le protocole expérimental décrit précédemment.

Les spectres obtenus pour un rat aux différents temps/fréquences de diffusion sont montrés sur la figure II.6.13. Immédiatement, on constate que l'amplitude des pics diminue quand la fréquence d'échantillonnage augmente, ce qui correspond à une augmentation de l'ADC.

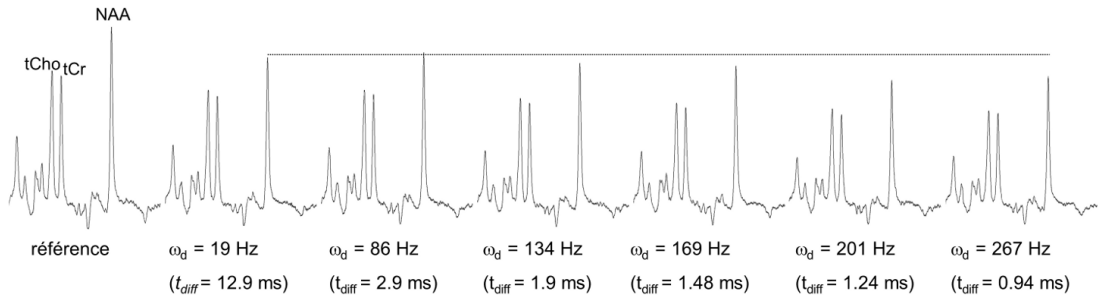


FIGURE II.6.13 – Spectres acquis pour les différentes fréquences de diffusion.

Pour chaque expérience, les ADC des trois métabolites NAA, tCr et tCho ont été calculés comme le logarithme de l'atténuation du signal. Les valeurs moyennes des ADC des métabolites obtenues sur les 20 expériences sont représentées sur la figure II.6.14.

Aux fréquences basses (i.e. long temps de diffusion), les valeurs d'ADC sont cohérentes avec la littérature ($0.18 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ pour le NAA, $0.19 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ pour tCr, $0.15 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ pour tCho).

On observe une augmentation de l'ADC quand la fréquence augmente. Quantitativement, elle est de 14% pour l'eau, 50% pour le NAA, 70% pour tCR et 90% pour tCho.

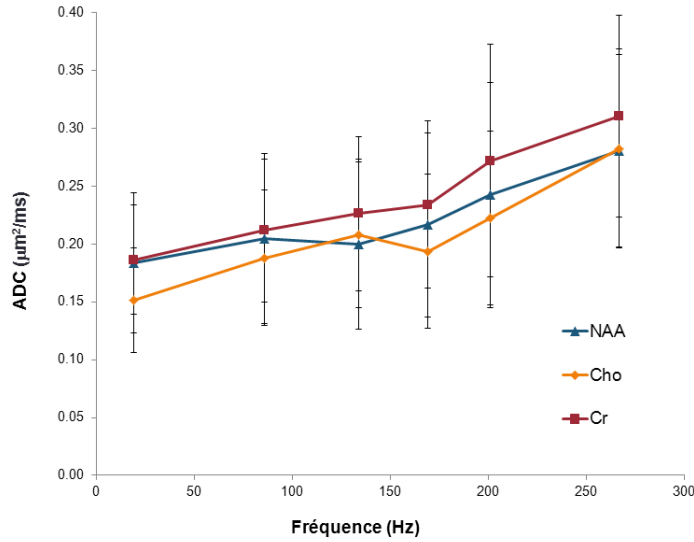


FIGURE II.6.14 – Valeurs moyennes des ADC des métabolites NAA, tCho, tCr obtenues pour différentes fréquences de diffusion sur 20 expériences. Les barres d'erreur correspondent directement à l'écart type.

Au cours de ces expériences, l'ADC de l'eau a aussi été évalué sur 8 expériences. La moyenne de ces mesures est présentée sur la figure II.6.15.

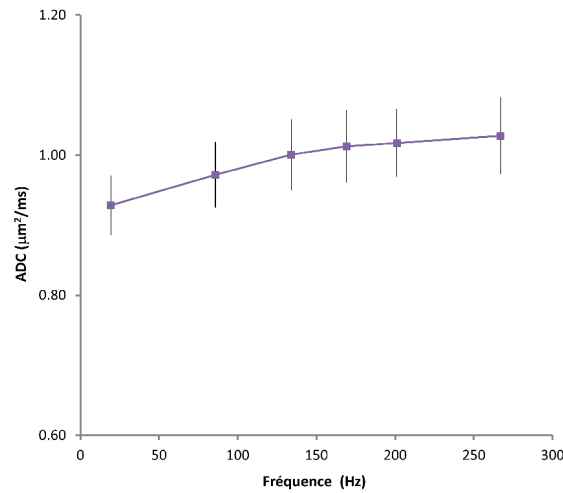


FIGURE II.6.15 – Valeurs moyennes des ADC de l'eau obtenues pour différentes fréquences de diffusion sur 10 expériences. Les barres d'erreur correspondent directement à l'écart type.

La croissance de l'ADC de l'eau étant moins importante que pour les métabolites (+ 11%), ces expériences permettent de vérifier que l'artéfact présent sur les expériences *in vitro* n'apparaît pas sur les mesures *in vivo*. De plus, ces valeurs sont cohérentes avec les études de diffusion anormale de l'eau déjà publiées (Does *et al.* (2003), Colvin *et al.* (2011)...).

6.5 Modélisation des résultats

La forme de la courbe d'ADC en fonction de la fréquence étant caractéristique de la subdiffusion, on peut donc conclure que le phénomène de transport prédominant dans les cellules est la diffusion encombrée. Pour ajuster nos données, nous avons développé des modèles de restriction censés représenter la diffusion dans les fibres et dans les corps cellulaires.

6.5.1 Description des modèles analytiques de diffusion encombrée

Nos modèles analytiques ont été développés en utilisant l'approximation gaussienne de la distribution de phase pour des géométries restreintes simples (Stepisnik, 1993). Cette approximation est valable pour les faibles valeurs de b quand l'atténuation du signal RMN est mono-exponentielle.

Dans le cas général, le spectre de diffusion est décrit par la formule suivante :

$$D(\omega) = \sum_k B_k \frac{a_k D_{free} \omega^2}{a_k D_{free}^2 + \omega^2} \quad (6.2)$$

où D_{free} est le coefficient de diffusion libre et a_k et B_k sont des coefficients qui dépendent de la géométrie du problème (cylindrique ou sphérique).

Deux modèles ont été développés pour décrire la diffusion qui peut se produire dans les cellules : le modèle de neurites et le modèle de corps cellulaires.

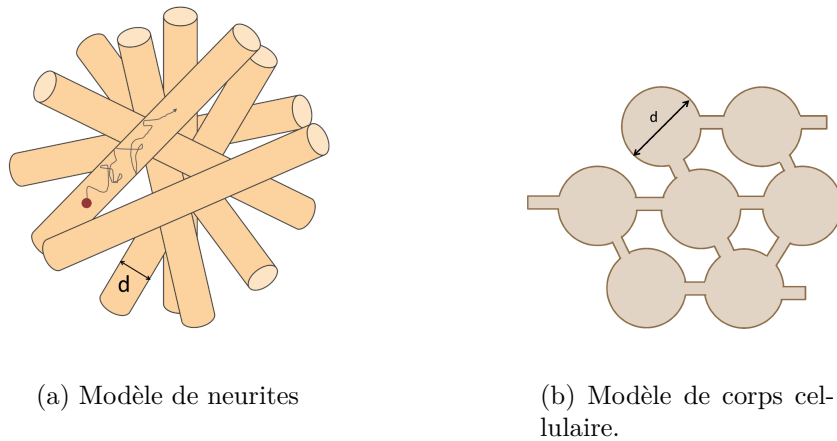


FIGURE II.6.16 – Modèles utilisés pour caractériser la diffusion anormale. d est le diamètre des cylindres dans le modèle de neurites et le diamètre des pores dans le modèle de corps cellulaires.

Modèle de neurites

Dans ce modèle, on a voulu représenter la diffusion dans les fibres telles que les axones et les dendrites. La diffusion a lieu dans des cylindres imperméables, orientés uniformément dans les trois directions de l'espace. Aucune direction n'est privilégiée. Tous les cylindres sont

identiques et caractérisés par leur rayon R (figure 6.16(a)).

Pour une géométrie cylindrique restreinte (gradient orthogonal au cylindre), les coefficients a_k et B_k de l'équation (6.2) sont définis par les équations :

$$a_k = \left(\frac{\mu_k}{R} \right)^2 \quad (6.3)$$

$$B_k = \frac{2 \left(\frac{R}{\mu_k} \right)^2}{\mu_k^2 - 1} \quad (6.4)$$

avec μ_k la k -ième racine de l'équation $J'_1(\mu) = 0$ où J'_1 est la dérivée de la fonction de Bessel du premier ordre.

Dans la direction parallèle à l'axe, la diffusion est libre.

Dans notre modèle, les cylindres sont orientés de manière isotrope dans l'espace. On définit pour chaque cylindre θ comme l'angle entre l'axe du cylindre et le gradient ($0 < \theta < \pi$). Le gradient peut s'écrire comme la somme de deux composantes : une orthogonale au cylindre, $G \cdot \sin(\theta)$, qui contribue à la diffusion restreinte et une parallèle, $G \cdot \cos(\theta)$, qui intervient dans l'expression de la diffusion libre.

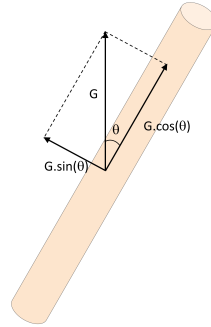


FIGURE II.6.17 – Décomposition du vecteur gradient G en deux composantes.

Dans le premier cas, le signal RMN pondéré en diffusion est proportionnel à $\exp(-b \cdot \sin^2(\theta) \cdot D(\omega))$. Dans le deuxième cas, il est proportionnel à $\exp(-b \cdot \cos^2(\theta) \cdot D_{free})$.

En intégrant sur l'espace, on obtient un spectre de diffusion $D(\omega)$ tel que $D(\omega = 0) = D_{free}/3$ et $D(\omega \rightarrow \infty) = D_{free}$.

Les inconnus de ce modèle sont le rayon des cylindres R et le coefficient de diffusion libre D_{free} .

Modèle de corps cellulaire

Ce modèle est un modèle de diffusion tortueuse à l'intérieur des corps cellulaires. Le milieu tortueux est modélisé par un réseau de sphères interconnectées (= milieu poreux). Les sphères

sont identiques et caractérisées par leur rayon R .

Pour une géométrie sphérique, les coefficients a_k et B_k sont définis par les équations :

$$a_k = \left(\frac{\mu_k}{R} \right)^2 \quad (6.5)$$

$$B_k = \frac{2 \left(\frac{R}{\mu_k} \right)^2}{\mu_k^2 - 2} \quad (6.6)$$

avec μ_k la k -ième racine de l'équation $\mu J'_{3/2}(\mu) - \frac{1}{2} J_{3/2}(\mu) = 0$ où $J_{3/2}$ est la fonction de Bessel de première espèce d'ordre $3/2$.

Le simple remplacement des coefficients a_k et B_k dans l'expression (6.2) conduit à un coefficient de diffusion $D(\omega)$ qui tend vers zéro quand la fréquence diminue. En effet, dans cette expression, l'interconnection entre les sphères n'a pas été prise en compte et on décrit un milieu restreint de forme sphérique. Pour modéliser un milieu tortueux, le terme phénoménologique D_{free}/T^2 est ajouté à l'expression de $D(\omega)$ (Stepisnik *et al.*, 2001).

Le spectre de diffusion obtenu avec ce modèle est tel que $D(\omega = 0) = D_{free}/T^2$ et $D(\omega \rightarrow \infty) = D_{free}$.

Les inconnus de ce modèle sont le rayon des pores R , le coefficient de diffusion libre D_{free} et la tortuosité T .

6.5.2 Ajustement des données

Les deux modèles de restriction sont utilisés pour ajuster nos données. Le résultat des modélisations sur la moyenne des ADC est représenté sur la figure II.6.18.

Les courbes d'ajustement obtenues sur les métabolites individuels ne sont pas représentées ici mais sont très semblables à celles obtenues pour la moyenne des ADC.

On constate que les deux modèles permettent d'ajuster les données expérimentales. Les paramètres obtenus après ajustement sont donnés dans le tableau II.6.1.

Pour estimer la précision de nos mesures, on utilise un algorithme de Monte Carlo.

Pour chacun des modèles, on répète 1000 fois les étapes suivantes :

- On calcule la différence entre le meilleur ajustement et les données expérimentales
- On détermine l'écart type de cette différence
- On génère d'autres jeux de données ayant le même écart type
- On ajuste les nouvelles données avec nos modèles analytiques

Les résultats obtenus permettent d'obtenir les erreurs données dans le tableau II.6.1.

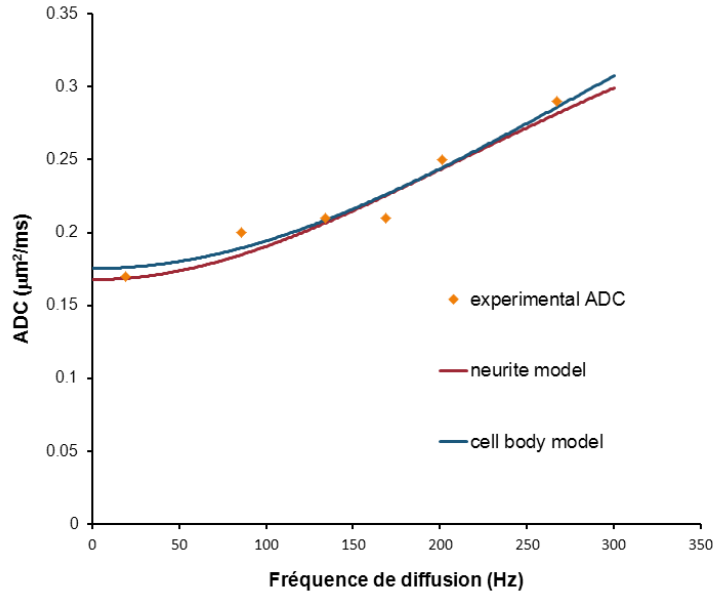


FIGURE II.6.18 – Modélisation de la moyenne des ADC dans le domaine fréquentiel en utilisant les modèles de neurites et de corps cellulaires.

	NAA	tCr	tCho	moyenne
Modèle de neurites				
$D_{free} (\mu\text{m}^2/\text{ms})$	0.59 ± 0.02	0.60 ± 0.03	0.52 ± 0.05	0.55 ± 0.03
$d (\mu\text{m})$	1.70 ± 0.04	1.88 ± 0.06	1.76 ± 0.13	1.82 ± 0.08
Modèle de corps cellulaire				
$D_{free} (\mu\text{m}^2/\text{ms})$	0.53 ± 0.15	0.55 ± 0.18	0.52 ± 0.24	0.55 ± 0.20
$d (\mu\text{m})$	1.69 ± 0.09	1.81 ± 0.11	1.77 ± 0.20	1.80 ± 0.12
T	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.8 ± 0.4	1.75 ± 0.34

TABLEAU II.6.1 – Paramètres déterminés à partir des modèles neurites et corps cellulaires pour les métabolites individuels et la moyenne des ADC. Les erreurs ont été calculés en utilisant la méthode de Monte Carlo (1000 tirages).

On observe que les résultats obtenus avec les deux modèles de diffusion sont très proches. De plus, malgré leur simplicité, ils donnent des valeurs proches de ce qui est connu pour l’organisation cellulaire. Les coefficients de diffusion libre sont de l’ordre de $0.55 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ (ce qui correspond à un cytoplasme 20% plus visqueux que l’eau libre), la distance caractéristique entre deux obstacles est inférieure à $2 \mu\text{m}$ et la tortuosité de 1.7. Ce dernier paramètre signifie que la distance pour aller d’un point à un autre est environ 1.7 fois plus grande que si la molécule se déplaçait en ligne droite.

6.6 Discussion

6.6.1 Absence de preuve sur l'existence de transports actifs

Les métabolites observées dans nos expériences de diffusion sont des molécules endogènes impliquées dans le métabolisme énergétique. On attribue au NAA des fonctions de régulateur de la synthèse protéique (Clarke *et al.*, 1975), de réserve d'acétate et d'aspartate (Birken & Oldendorf, 1989). Il serait aussi impliqué dans la lipogénèse et la myélinisation (Burri *et al.*, 1991). Le couple formé par la créatine et la phosphocréatine joue un rôle de tampon énergétique qui maintient un niveau bas d'ADP et un niveau constant d'ATP via le système créatine kinase. Enfin, les composés choline sont impliqués dans la synthèse et la dégradation des membranes phospholipidiques. Le transport de ces trois métabolites est donc important pour la vie des cellules, ce qui n'était pas le cas des molécules exogènes utilisées dans les méthodes de mesures optiques mais aussi de l'eau étudiée en RMN. On imagine que la proportion de métabolites transportées par les transports actifs (s'ils existent) est plus importante.

Or pour les métabolites NAA, tCr et tCho, la variation de l'ADC en fonction du temps de diffusion est caractéristique de la subdiffusion. On peut donc conclure que le transport prédominant, sur l'échelle de temps considérée, est la diffusion encombrée. Même s'il n'est pas possible de rejeter complètement l'existence de courants cytoplasmiques dans le cerveau, leur contribution est au plus négligeable dans le transport des métabolites dans les cellules du cerveau contrairement à ce qui avait pu être postulé (Agutter *et al.* (1995), Wheatley (1998), Wheatley (1999)).

Pour comparer nos résultats avec les mesures déjà réalisées avec des méthodes optiques. On calcule le coefficient α de la diffusion anormale tel que $ADC = t^{\alpha-1}$. Avec nos données, on trouve $\alpha = 0.8$ ce qui est cohérence avec les données de la littérature qui donne des valeurs de α comprises entre 0.5 et 0.8 pour la diffusion anormale dans des cellules cérébrales (Malchus & Weiss (2010), Santamaria *et al.* (2006)).

6.6.2 Retour sur les données de la littérature

Nous avons adapté nos modèles de diffusion pour les appliquer dans le domaine temporel et ainsi pouvoir prolonger les ajustements aux données de la littérature. Pour les précédentes études, les gradients de diffusion étaient des gradients bipolaires caractérisés par leur temps de diffusion t_{diff} . Dans le domaine fréquentiel, celui de nos modèles, ils sont caractérisés par leur spectre de modulation $F(\omega)$, approximativement défini comme des sinus cardinaux centré en zéro et de largeur à mi-hauteur $1/t_{diff}$. L'ADC est alors égal à l'intégrale de $F(\omega)^2 D(\omega)$ avec $D(\omega)$ le spectre de diffusion (formule 5.17 du chapitre 5).

Pour le modèle de corps cellulaire, une modification supplémentaire a été apportée au programme. En effet, à temps de diffusion long, la restriction devient prépondérante et la tortuosité peut être vue comme une viscosité apparente. Le coefficient de diffusion du cytoplasme est alors un coefficient de diffusion apparent égal à D_{free}/T^2 . Le modèle devient un modèle de restriction sphérique où le rayon R correspond maintenant au rayon de la cellule plutôt qu'à celui des pores. En imposant le coefficient de diffusion égal à D_{free}/T^2 , D_{free} et T étant les valeurs obtenues lors des modélisations à temps courts, on ajuste les données de la littérature. Le seul paramètre libre étant le rayon de la cellule R .

La prolongation des ajustements à temps courts et leur superposition avec les données de la littérature sont présentées sur la figure II.6.19.

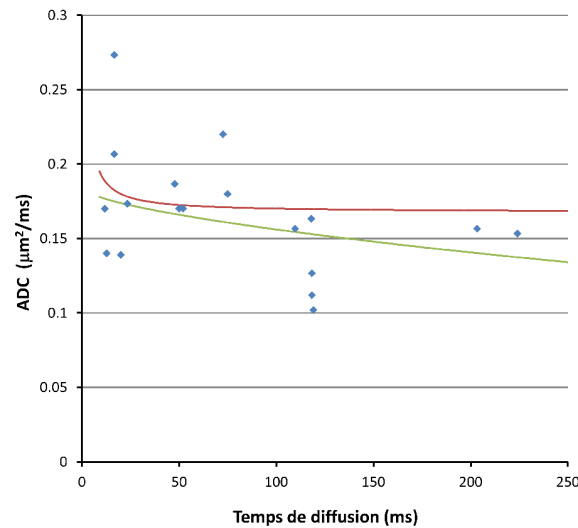


FIGURE II.6.19 – Prolongation des ajustements obtenus à temps de diffusion courts avec le modèle de neurite (rouge) et le modèle de corps cellulaire (vert) et superposition avec les données de la littérature.

Pour le modèle de neurite, en rouge sur la figure, l'ADC décroît très rapidement et atteint un plateau $ADC \sim D_{free}/3$. Pour le modèle de corps cellulaire modifié, en vert, l'ajustement des données de la littérature donne un rayon d'environ $80 \mu m$. Ce qui paraît un peu élevé pour la taille d'un corps cellulaire...

Les prolongations des ajustements obtenus à temps de diffusion courts se superposent plutôt bien avec les données de la littérature pour les deux modèles. Ainsi des modèles de diffusion contrainte, sans avoir à modéliser de transports actifs, suffisent à tenir compte de l'ensemble des données de la littérature. Cela renforce notre conclusion qui donne la diffusion encombrée comme le principal phénomène de transport dans les cellules.

6.6.3 Cohérence des valeurs numériques avec la littérature

Tailles caractéristiques

Les modèles de diffusion ont donné des tailles caractéristiques de restriction de l'ordre de $2\ \mu\text{m}$. Pour le modèle de neurite, cela correspond au diamètre des fibres. Cela peut être le diamètre des processus astrocytaires ou des axones. Cette valeur est cohérente avec la littérature où le diamètre des processus des astrocytes est de l'ordre de $2\text{-}3\ \mu\text{m}$ (Oberheim *et al.* (2008), Sun *et al.* (2010)) alors que celui des neurones est compris entre 0.2 et $20\ \mu\text{m}$ avec une forte majorité d'axones ayant un diamètre autour du micromètre (Perge *et al.*, 2009). Pour le modèle de corps cellulaires, la taille caractéristique de restriction peut être vue comme la distance entre les obstacles (Luby-Phelps, 2000).

Viscosité du cytoplasme

Pour tenter d'évaluer le coefficient de diffusion libre D_{free} , des études ont été réalisées dans le corps calleux chez l'homme, où les fibres de matière blanche sont orientées selon une direction préférentielle (Kroenke *et al.* (2004), Upadhyay *et al.* (2007)). Dans ces études, on s'intéresse particulièrement au NAA qui est exclusivement dans les neurones. Si l'application des gradients de diffusion est faite parallèlement aux fibres, on mesure la composante axiale de l'ADC, $ADC_{//}$, qui n'est pas sensible à la restriction des membranes. Les valeurs d' $ADC_{//}$ obtenues dans ces études sont comprises entre 0.25 et $0.36\ \mu\text{m}^2/\text{ms}$ et donc bien inférieures à notre mesure de D_{free} . En effet, les mesures se font à des temps de diffusion assez élevés (supérieurs à $40\ \text{ms}$) et on ne peut pas négliger la présence d'organelles et la tortuosité du cytoplasme dans les fibres. La mesure de $ADC_{//}$ correspondrait plutôt au coefficient de diffusion apparent prenant en compte la tortuosité D_{free}/T^2 . La différence entre les données peut aussi s'expliquer par une dispersion angulaire des fibres de la matière blanche qui sous-estime la composante parallèle de l'ADC (Ronen *et al.*, 2013).

6.6.4 Meilleure modélisation de la diffusion intracellulaire ?

Les deux modèles développés dans cette thèse donnent des résultats très semblables que ce soit pour la distance caractéristique de restriction ou pour la valeur du coefficient de diffusion libre D_{free} . Avec les mesures réalisées, il est impossible de déterminer quel modèle représente le mieux la diffusion intracellulaire dans le cerveau. Pour cela, il faudrait rallonger les temps de diffusion pour voir si l'ADC tend vers une valeur finie ($D_{free}/3$), ce qui correspondrait à une diffusion essentiellement dans des fibres, ou vers zéro, ce qui correspondrait à une diffusion restreinte dans un corps cellulaire.

En modélisant les données de la littérature réalisées à temps de diffusion plus long, on a tenté de répondre à cette question. Le rayon de cellule obtenu avec le modèle de corps cellulaire

paraît relativement élevé. Le modèle neurite semble être plus représentatif de la diffusion des métabolites dans le cerveau. Mais comme nous l'avons dit précédemment, les données de la littérature sont très bruitées et ne permettent pas de conclure de manière catégorique.

Des expériences à temps de diffusion longs sont actuellement réalisées dans le laboratoire pour déterminer le meilleur modèle de diffusion dans le cerveau.

6.7 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons développé une séquence de spectroscopie RMN de diffusion permettant la première étude de la diffusion anormale de métabolites cérébraux chez le rat. L'utilisation de cette séquence chez le rat sain a montré que les ADC des métabolites NAA, tCr et tCho augmentaient avec le temps de diffusion. Cette variation est caractéristique de la subdiffusion. La contribution des transports actifs, parfois présentée comme essentielle, est donc négligeable dans les cellules du cerveau à cette échelle de temps. L'interprétation des mesures de diffusion se fera donc exclusivement en utilisant le formalisme de la diffusion brownienne encombrée. Pour analyser nos résultats, deux modèles de diffusion restreinte, basés sur la distribution gaussienne de la phase, ont été développés. Ces deux modèles sont censés représenter des types de diffusion existants dans le cerveau : la diffusion dans les fibres et la diffusion dans les corps cellulaires tortueux. L'ajustement de nos données avec les deux modèles conduit à une taille caractéristique de restriction de l'ordre de $2\ \mu\text{m}$ et à une viscosité du cytoplasme 20% supérieure à celle de l'eau libre à 37°C .

Finalement, cette étude prouve que la spectroscopie RMN de diffusion à temps de diffusion courts est sensible à la viscosité et l'encombrement intracellulaire. Cela ouvre des portes pour l'utilisation de l'ADC comme biomarqueur de la neurodégénérescence.

Notons que la séquence présentée dans ce chapitre est assez difficile à mettre en œuvre. Pour les études qui suivent, nous nous limiterons à un seul temps de diffusion, suffisamment court pour être sensible aux variations de viscosité et d'encombrement à courte échelle. Néanmoins, cela ne sera pas suffisant pour extraire des données chiffrées sur les tailles caractéristiques de restriction et la viscosité.

Application à un modèle de maladie neurodégénérative

7.1 Introduction

L'étude précédente a montré que la spectroscopie de diffusion à temps de diffusion courts était sensible à la viscosité du cytoplasme et à l'encombrement à courte échelle. L'ADC à temps de diffusion court apparaît donc comme un biomarqueur intéressant dans l'étude des maladies neurodégénératives où l'on peut observer une accumulation de protéines dans les cellules, à la fois sous forme soluble (augmentation de la viscosité ?) et sous forme d'agrégats (augmentation de l'encombrement cellulaire ?).

La firme Eli Lilly a souhaité collaborer avec notre équipe pour suivre pendant 6 mois des souris transgéniques (rTg4510), modèle de taupathie, en utilisant la spectroscopie de diffusion à court temps de diffusion. Ce modèle animal présente une forme évolutive de la pathologie qui se traduit dans les neurones, par l'apparition progressive de lésions tau (soluble puis sous forme d'agrégats) accompagnée d'une activité astrocytaire. On s'attend à ce que les mesures de diffusion soient sensibles aux changements intracellulaires décrits dans la littérature et permettent de réaliser un suivi longitudinal de la propagation de la neurodégénérescence.

Ce travail se décompose en 2 parties :

- une partie méthodologique : le développement d'une séquence de spectroscopie RMN pondérée en diffusion permettant le suivi longitudinal d'animaux fragiles
- une partie expérimentale : l'étude pré-clinique menée sur 20 souris transgéniques rTg4510.

7.2 Description du projet

Tau est une protéine qui se lie aux microtubules et les stabilise. Les mutations de tau ont pour conséquence de diminuer l'adhérence de la liaison entre la protéine et les microtubules entraînant une instabilité de ces derniers et par des mécanismes encore inexpliqués, une neurodégénérescence.

Dans ce projet, nous nous intéressons à un modèle murin de taupathie (maladie d'Alzheimer, démence frontotemporale avec parkinsonisme lié au chromosome 17, maladie de Pick...). Les souris transgéniques utilisées sont des souris exprimant la forme mutée de tau P301L (rTg4510). Leur phénotype présente la déposition progressive d'agrégats neurofibrillaires (NFT : Neurofibrillary Tangles) dans le cerveau et particulièrement dans l'hippocampe, une perte neuronale et des déficits de mémoire. De plus ce modèle possède la particularité d'être réversible par un traitement à base de doxycycline. Cette molécule a pour effet de supprimer l'expression de tau ce qui améliore les capacités cognitives des animaux, diminue la perte neuronale dans l'hippocampe mais n'empêche pas les NFT de continuer à s'accumuler si le traitement commence après l'âge de 4 mois (Santacruz *et al.*, 2005).

Dans cette étude, nous suivons 20 souris rTg4510 mâles pendant 6 mois. Le premier temps de mesure a lieu à l'âge de 3 mois, le second à l'âge de 6 mois et le troisième à l'âge de 9 mois. Après le second point de mesure, les souris sont réparties en deux groupes : un groupe traité à la doxycycline et un groupe contrôle.

A chaque temps de mesure, plusieurs paramètres ont été évalués :

- le volume de l'hippocampe
- la concentration des métabolites
- l'ADC des métabolites

La concentration et les ADC des métabolites sont évalués dans un voxel centré sur l'hippocampe.

Pour réaliser ce projet, des outils adaptés ont été développés. En particulier, une séquence de spectroscopie de diffusion robuste qui permet le suivi longitudinal d'animaux fragiles.

7.3 Développement d'une séquence de diffusion

Pour ce travail, nous avons développé une nouvelle séquence de diffusion qui permet de mesurer de faibles variations d'ADC de manière reproductible.

La séquence à développer doit remplir un certain nombre de conditions :

- une séquence qui minimise les biais
- un temps d'acquisition relativement court (adapté aux animaux fragiles)

- des temps de diffusion assez courts pour être sensibles au milieu intracellulaire et en particulier à l'accumulation des NFT dans les neurones

Parmi les biais possibles, on s'intéressa plus particulièrement à l'anisotropie de la diffusion, aux mouvements et aux termes croisés.

Notons qu'il n'est donc pas possible d'utiliser directement la séquence de spectroscopie de diffusion RMN présentée dans le chapitre 6. En effet, le passage du rat à la souris est extrêmement critique en terme de sensibilité, et encore plus dans cette étude où l'on veut aussi réduire le volume d'intérêt à l'hippocampe.

7.3.1 Mesure de la trace du tenseur de diffusion

Les temps de diffusion courts restent privilégiés dans cette étude pour être sensible au microenvironnement intracellulaire et à l'accumulation de protéines. Cependant, même à des temps de diffusion de quelques millisecondes, le coefficient de diffusion reste sensible à la restriction par les parois des fibres (diamètre des fibres de l'ordre du micromètre d'après l'étude précédente) et à leur organisation anisotrope. En toute rigueur, la diffusion est complètement décrite par un tenseur de diffusion \mathbf{D} .

$$\mathbf{D} = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{pmatrix} \quad (7.1)$$

Pour décrire la diffusion *in vivo*, il faut donc mesurer l'atténuation du signal dans 6 directions différentes. En spectroscopie, les problèmes d'anisotropie sont souvent négligés. Les mesures se font pour la plupart dans une seule direction. Cela était le cas pour notre étude de la diffusion anormale dans le cerveau. Pour minimiser les biais dus à l'anisotropie et pour avoir une mesure représentative du milieu intracellulaire, reproductible quel que soit l'animal et la position de voxel, on préférera mesurer la trace du tenseur de diffusion : $ADC_{Tr} = D_{xx} + D_{yy} + D_{zz}$. Cette valeur est indépendante du référentiel dans lequel on se place et n'est donc pas sensible à l'anisotropie. De plus, pour être insensible au mouvement, nous avons développé une séquence permettant d'acquérir la trace du tenseur de diffusion en un coup.

Dans le passé, plusieurs séquences ont été proposées pour réaliser cette mesure : une séquence d'imagerie (Mori & van Zijl, 1995), une séquence PRESS pondérée en diffusion (de Graaf *et al.*, 2001) et une séquence LASER pondérée en diffusion développée dans notre laboratoire et publiée récemment (Valette *et al.*, 2012). Acquérir la trace en un seul coup ne réduit pas forcément le temps de mesure, car il faut accumuler pour augmenter le signal sur bruit, mais permet d'être moins sensible aux variations lentes (shim, température...).

Pendant cette thèse, une nouvelle séquence de spectroscopie de diffusion a été développée pour mesurer la trace du tenseur de diffusion. Elle consiste en une amélioration d'une séquence LASER pondérée en diffusion (Valette *et al.*, 2012). Par la suite, nous l'appellerons DW-LASER (DW pour Diffusion Weighted). Elle est représentée sur la figure II.7.1. Comme

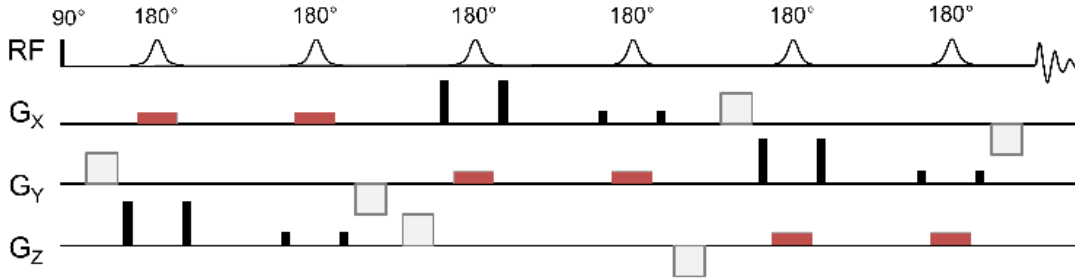


FIGURE II.7.1 – Séquence de diffusion LASER initiale. δ est la durée des gradients de diffusion et Δ la durée séparant les deux gradients de diffusion d'un même bloc.

son nom l'indique, cette séquence est basée sur la séquence LASER (Garwood & DelaBarre, 2001). Elle est constituée de trois blocs orthogonaux. Les blocs sont constitués de deux impulsions adiabatiques d'inversion d'une durée T_p et sélectionnent chacun un plan. Le premier sélectionne un plan orthogonal à x, le deuxième un plan orthogonal à y et le troisième un plan orthogonal à z. Les 3 plans sont orthogonaux entre eux et leur intersection correspond au voxel d'où provient le signal.

Pour réaliser la pondération en diffusion, des gradients bipolaires, de durée δ , ont été insérés dans chaque bloc avant la première impulsion et après la deuxième impulsion. La pondération en diffusion se fait successivement selon les trois directions orthogonales y, z et x (avec un facteur de pondération $\frac{b}{3}$). Le signal obtenu à la fin de la séquence vaut donc :

$$S = S_0 \exp\left(-\frac{b}{3}D_{yy}\right) \exp\left(-\frac{b}{3}D_{zz}\right) \exp\left(-\frac{b}{3}D_{xx}\right) \quad (7.2)$$

$$= \exp\left(-\frac{b}{3}(D_{xx} + D_{yy} + D_{zz})\right) = \exp(-b\text{ADC}_{Tr}) \quad (7.3)$$

La séquence DW-LASER permet donc de mesurer la trace du tenseur de diffusion ADC_{Tr} en un seul coup et possède les avantages de la séquence LASER (bonne localisation, adiabaticité, augmentation des temps de relaxation T_2 , immunité partielle à la J-modulation) et est partiellement insensible aux termes croisés.

L'inconvénient de cette séquence est de ne pas pouvoir atteindre des pondérations en diffusion fortes aux temps d'écho et temps de diffusion courts.

L'objectif de ce travail est donc d'augmenter le facteur de pondération en diffusion b de la séquence originale pour pouvoir diminuer le temps d'écho de la séquence en maintenant b constant et ainsi mesurer l'ADC de plus de métabolites dans de plus petits volumes.

7.3.2 Amélioration 1 : Insertion de gradients de diffusion dans la séquence initiale

La première modification consiste à optimiser le temps de la séquence en insérant des gradients de diffusion pendant le temps libre de la séquence originale. Dans un bloc de la séquence LASER pondérée en diffusion, des gradients bipolaires identiques à ceux initialement présents sont appliqués entre les impulsions adiabatiques d'inversion comme représenté sur la figure II.7.2. Ce schéma permet d'augmenter le facteur de pondération en diffusion

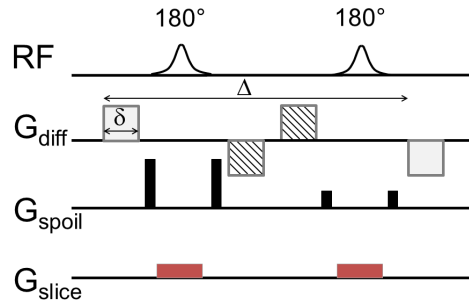


FIGURE II.7.2 – Insertion de gradients de diffusion de durée δ dans un bloc de la séquence DW-LASER originale.

en maintenant le temps d'écho inchangé et de minimiser les courants de Foucault grâce à l'utilisation de gradients bipolaires (Alexander *et al.*, 1997).

Pour la séquence sans temps mort, le facteur de pondération b est donné par la formule 7.4.

$$b = \int_0^{TE} k_{diff}^2 dt = \gamma^2 G_{diff}^2 \delta^2 (TE + 4\delta) \quad (7.4)$$

Comparé au facteur de pondération de la séquence originale, b est augmenté de $\frac{TE+4\delta}{TE-4\delta}$.

Notons que cette modification a également pour effet de diminuer le temps de diffusion de la séquence. En effet, on peut considérer que chaque un bloc de la séquence DW-LASER optimisée est constitué de deux gradients effectifs de même durée $TE/6$ et de polarité opposée. Le premier gradient effectif correspond à l'association des deux gradients qui entourent la première impulsion adiabatique et son intégrale est positive. Il est immédiatement suivi d'un deuxième gradient effectif qui correspond aux deux gradients entourant la deuxième impulsion adiabatique et dont l'intégrale est égale à celle du premier gradient effectif au signe près. Finalement, l'intégrale des gradients de diffusion effectifs dans un bloc est nulle. Par analogie avec les gradients bipolaires, il est naturel de définir une durée de gradient effective $\delta_{eff} = TE/6$ et un temps de séparation entre gradients effectifs $\Delta_{eff} = TE/6$. Le temps de diffusion peut être calculé en utilisant la formule classique : $t_{diff} = \Delta_{eff} - \delta_{eff}/3$. Initialement égal à $t_{diff} = 1/3(TE - 4\delta)$, le temps de diffusion diminue et vaut $t_{diff} = TE/9$.

Contribution des termes croisés

Dans cette partie, nous étudions l'effet de l'insertion de gradients de diffusion supplémentaires sur les termes croisés. La séquence originale DW-LASER permettait une relative immunité aux termes croisés, nous voulons vérifier que cela reste le cas dans la nouvelle séquence.

Dans les séquences de spectroscopie de diffusion, la pondération en diffusion est décrite par le facteur b :

$$b = \int_0^{\text{TE}} k_{diff}(t)^2 dt \quad (7.5)$$

où $k_{diff}(t)$ est le moment du gradient de diffusion défini comme l'intégrale du gradient de diffusion en fonction du temps :

$$k_{diff}(t) = \gamma \int_0^t \mathbf{G}_{diff}(t') dt' \quad (7.6)$$

Cependant, dans ce calcul, on omet la contribution des autres gradients à la pondération en diffusion. Pour être tout à fait complet, le vecteur gradient responsable de la pondération en diffusion totale est :

$$\mathbf{G}_{tot} = \mathbf{G}_{diff} + \mathbf{G}_{spoil} + \mathbf{G}_{slice} + \mathbf{G}_0 \quad (7.7)$$

Avec \mathbf{G}_{diff} le gradient de diffusion, \mathbf{G}_{spoil} le gradient de spoiling, \mathbf{G}_{slice} le gradient de sélection de coupe et \mathbf{G}_0 le gradient résiduel constant. Tous ces gradients sont des vecteurs et ont a priori des composantes dans les trois directions de l'espace.

Pour calculer b , il faut prendre en compte tous les produits entre moments des gradients et en particulier les termes $k_{diff} \cdot k_{slice}$, $k_{diff} \cdot k_{spoil}$ et $k_{diff} \cdot k_0$ (tous les moments des gradients étant définis comme k_{diff} (7.6)). La contribution des autres termes croisés disparaît dans le calcul de l'ADC car ils sont présents et identiques quel que soit la valeur de b .

Si l'on considère que l'inversion se fait au centre des pulses adiabatiques, on obtient les termes croisés donnés par la figure II.7.3. La symétrie particulière de la séquence a pour conséquence d'annuler l'intégrale de $k_{diff} \cdot k_{slice}$ et $k_{diff} \cdot k_0$. Pour les "spoilers", le terme croisé ne s'annule pas car pour éviter les échos stimulés, ils n'ont pas la même amplitude autour de la première et de la deuxième impulsion ($\mathbf{G}_{spoil_1} \neq \mathbf{G}_{spoil_2}$). Le terme croisé vaut :

$$\int_0^{\text{TE}} k_{diff}(t) k_{spoil}(t) dt = \gamma^2 \mathbf{G}_{diff} (\mathbf{G}_{spoil_1} - \mathbf{G}_{spoil_2}) T_{spoil} (T_{spoil} + T_p) \delta \quad (7.8)$$

Avec des impulsions adiabatiques, l'inversion peut se produire à tout moment de l'impulsion (quand la fréquence de l'impulsion vaut la fréquence de Larmor). La symétrie présentée dans la figure II.7.3 est cassée et d'une manière générale, les termes croisés ne s'annuleront plus. On définit le moment où se produit l'inversion par $t = \alpha T_p / 2$, T_p étant la durée de l'impulsion

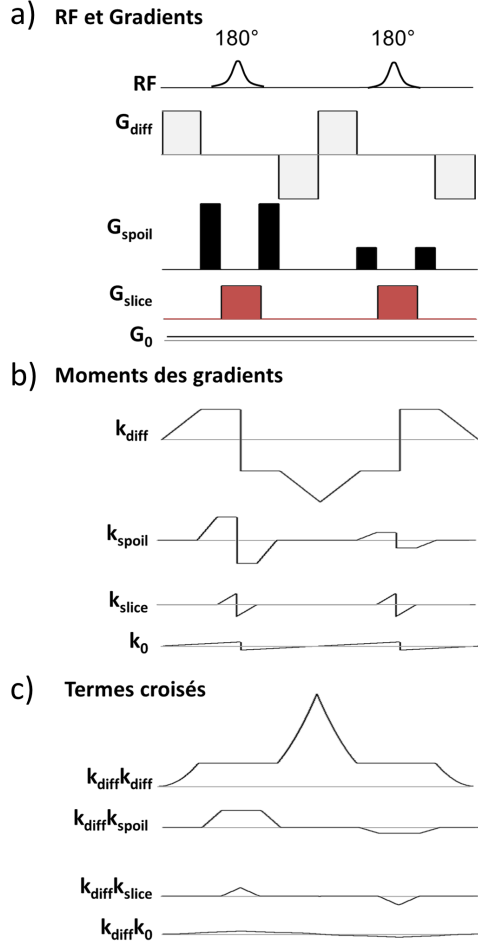


FIGURE II.7.3 – Calcul des termes croisés pour un bloc de la séquence LASER pondérée en diffusion. a) Chronogramme des impulsions et des gradients. b) Intégration des gradients en fonction du temps c) Calcul des termes croisés entre le gradient de diffusion (G_{diff}) et les gradients de sélection (G_{slice}), les spoilers (G_{spoil}) et le gradient constant résiduel (G_0)

adiabatique et $-1 < \alpha < 1$. Bien que l'application d'une impulsion adiabatique entraîne une dispersion de la phase (voir chapitre 4), son seul effet sur le calcul de la pondération en diffusion réside dans l'inversion du signe du moment du gradient k au moment de l'inversion (Valette *et al.*, 2010).

Les termes croisés $k_{diff}.k_{slice}$ et $k_{diff}.k_0$ s'écrivent donc :

$$\int_0^{TE} k_{diff}(t)k_{slice}(t)dt = \alpha\gamma^2 G_{diff}G_{slice}T_p\delta(\delta + TE/6) \quad (7.9)$$

$$\int_0^{TE} k_{diff}(t)k_0(t)dt = \alpha\gamma^2 G_{diff}G_0T_p\delta(\delta + TE/6) \quad (7.10)$$

Ces deux termes sont proportionnels à α et on retrouve bien qu'ils s'annulent quand l'inversion a lieu au centre de l'impulsion.

Comme en général, $G_{slice} > G_0$, le terme croisé $k_{diff}k_{slice}$ est plus important que $k_{diff}k_0$, la contamination maximale est bornée par le rapport C .

$$C = \left| \frac{2 \int_0^{\text{TE}} k_{diff}(t) k_{slice} dt}{\int_0^{\text{TE}} k_{diff}(t)^2 dt} \right| = \frac{2 G_{slice} T_p}{G_{diff}} \frac{\delta + \text{TE}/6}{\delta(\text{TE} + 4\delta)} \quad (7.11)$$

En posant THK l'épaisseur de la coupe sélectionnée par les impulsions adiabatiques, BW la bande passante de l'impulsion adiabatique et R le facteur temps-bande passante de l'impulsion. On peut remplacer G_{slice} par $\frac{2\pi}{\gamma} \frac{1}{\text{THK}} \frac{R}{T_p}$ dans l'expression (7.11). Enfin en considérant le cas le plus critique $\alpha = 1$, on obtient une borne supérieure C_{max} .

$$C_{max} = \frac{4\pi}{\gamma} \frac{1}{\text{THK}} \frac{R}{G_{diff}} \frac{\delta + \text{TE}/6}{\delta(\text{TE} + 4\delta)} \quad (7.12)$$

L'application numérique avec les paramètres de la séquence montrera qu'il est possible de négliger la contribution des termes croisés comme cela était le cas dans la séquence originale.

Notons que dans la séquence de diffusion avec gradients oscillants (chapitre 6), il n'existe pas de contribution des termes croisés à la pondération en diffusion : les termes croisés $k_{diff} \cdot k_{slice}$ et $k_{diff} \cdot k_{spoil}$ sont nuls car le moment du gradient de diffusion k_{diff} est revenu à zéro quand les gradients G_{slice} et G_{spoil} sont allumés. Concernant le terme $k_{diff} \cdot k_0$, il s'annule à la fin du deuxième gradient oscillant.

7.3.3 Amélioration 2 : Optimisation des directions des gradients de diffusion

La deuxième amélioration apportée à la séquence DW-LASER est l'optimisation des directions des gradients de diffusion pour maximiser leurs amplitudes.

La séquence DW-LASER est construite par juxtaposition de trois blocs de diffusion orthogonaux. Pour chaque bloc i ($i = 1, 2, 3$), le gradient de diffusion s'écrit de la forme $G_{max} \cdot \mathbf{G}_i$ où G_{max} est l'amplitude maximale du gradient sur un axe et \mathbf{G}_i le vecteur gradient exprimé dans le repère (x,y,z). Par construction, les coefficients de \mathbf{G}_i sont inférieurs à 1 en valeur absolue. Dans la séquence originale, les vecteurs gradients sont les vecteurs unitaires du repère (x,y,z) : $\mathbf{G}_1 = (1, 0, 0)$, $\mathbf{G}_2 = (0, 1, 0)$ et $\mathbf{G}_3 = (0, 0, 1)$ (en gris sur la figure II.7.4). Il est possible de combiner les différents gradients pour maximiser les amplitudes. En reconnaissant que les trois gradients sont équivalents, on peut construire une nouvelle base par permutation circulaire du gradient $\mathbf{G}_1 = (x, y, z)$, soit $\mathbf{G}_2 = (z, x, y)$ et $\mathbf{G}_3 = (y, z, x)$. Enfin, en utilisant le fait que les gradients doivent être orthogonaux pour mesurer ADC_{Tr} , on démontre que les directions optimales qui maximisent les amplitudes des gradients sont $\mathbf{G}_1 = (1, 1, -0.5)$, $\mathbf{G}_2 = (-0.5, 1, 1)$ et $\mathbf{G}_3 = (1, -0.5, 1)$. Le détail des calculs est présenté dans l'annexe A. Le nouveau repère est représenté en vert sur la figure II.7.4. L'amplitude des gradients est augmentée de $\sqrt{1^2 + 1^2 + 0.5^2} = 1.5$ par rapport au repère physique de

l'IRM (en gris sur la figure II.7.4). Le facteur b étant proportionnel à \mathbf{G}^2 , la pondération en diffusion est augmentée d'un facteur 2.25.

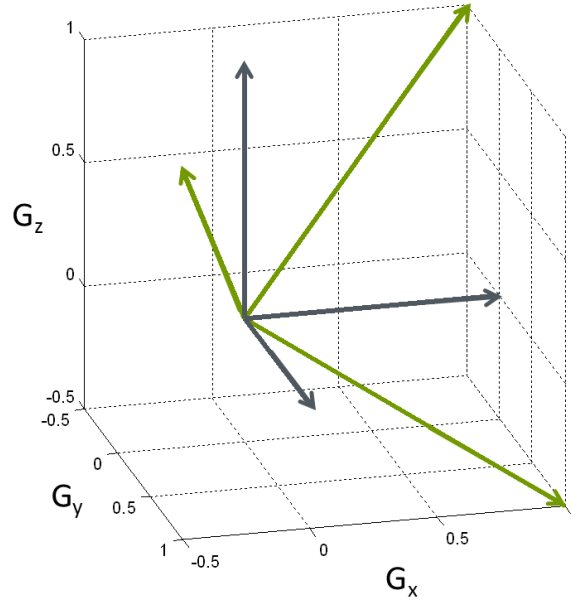


FIGURE II.7.4 – Optimisation des directions des gradients de diffusion.

7.3.4 Séquence optimisée

Finalement, la séquence LASER pondérée en diffusion optimisée est présentée sur la figure II.7.5.

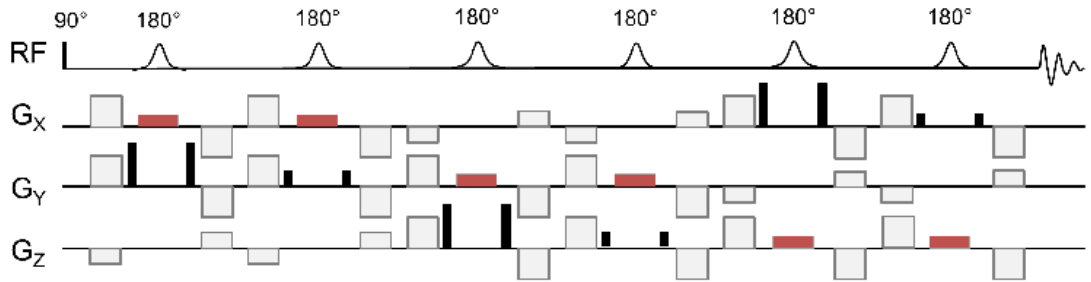


FIGURE II.7.5 – Séquence de diffusion LASER optimisée.

Le facteur de pondération en diffusion est alors :

$$b = 2.25\gamma^2 G_{diff}^2 (\text{TE} + 4\delta) \quad (7.13)$$

Soit une augmentation de b de $2.25 \frac{\text{TE}+4\delta}{\text{TE}-4\delta}$ par rapport à la séquence initiale.

7.4 Protocole expérimental

Système IRM

Les expériences ont été réalisées sur l'IRM 7 T Agilent de MIRCen, équipé de gradients pouvant atteindre 600 mT/m sur chaque axe. La transmission radiofréquence a été réalisée avec une antenne volumique alors que la réception a été effectuée avec une antenne surfacique en quadrature équipée de préamplificateurs intégrés et d'un découplage actif (Rapid Biomedical).

Expérimentation animale

Toutes les procédures d'expérimentation animales ont été réalisées en accord avec les recommandations de l'Union Européenne pour le soin et l'utilisation d'animaux de laboratoire et conformément aux règlements éthiques du ministère français de l'agriculture et des forêts. Les souris sont positionnées dans un cadre stéréotaxique, constitué de barres d'oreilles et d'un mors, dessiné spécialement pour minimiser le mouvement dans cette campagne d'expériences. Le positionnement de la souris est montré sur la figure II.7.6. Les souris sont

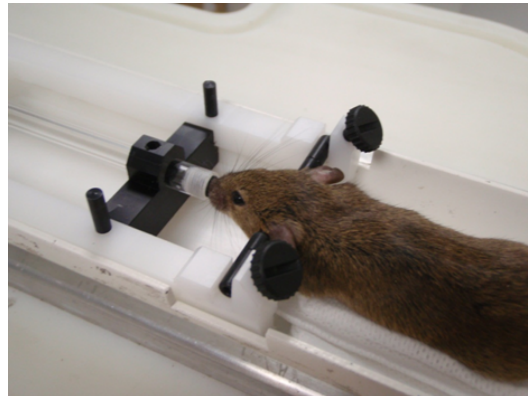


FIGURE II.7.6 – Souris dans le cadre stéréotaxique permettant de limiter les mouvements lors des mesures de diffusion.

anesthésiées à l'isoflurane ($\sim 1.8\%$) dans un mélange d'air et d'oxygène (1:1). Elles sont maintenues à température constante grâce à un système d'air chaud.

Dans cette étude, l'utilisation d'un cadre stéréotaxique a été indispensable pour éviter les mouvements de translation et de rotation de l'animal au cours de l'examen. En effet, sans le cadre, les mouvements de translation conduisaient à des variations de phase très importantes, comme le montre la figure 7.7(a). Ces mouvements peuvent en théorie être corrigés en rephasant les spectres. Cependant à cause de la faible sensibilité de nos mesures, le signal obtenu en un coup est trop faible pour réaliser un rephasage individuel des spectres. De plus, il n'y a aucun moyen de corriger les mouvements de rotation, qui entraînent des pertes de signal. Finalement, sans le cadre, la somme directe des acquisitions conduisait à une sous-

estimation du signal et donc à une sur-évaluation de l'ADC. Avec le cadre, les variations de phase ont quasiment disparues (figure 7.7(b)) ce qui permet de sommer directement les spectres sans avoir besoin de rephasage individuel. De plus, la stabilité de la phase montre l'absence de translation dans les trois directions de l'espace et donc certainement l'absence de rotation.

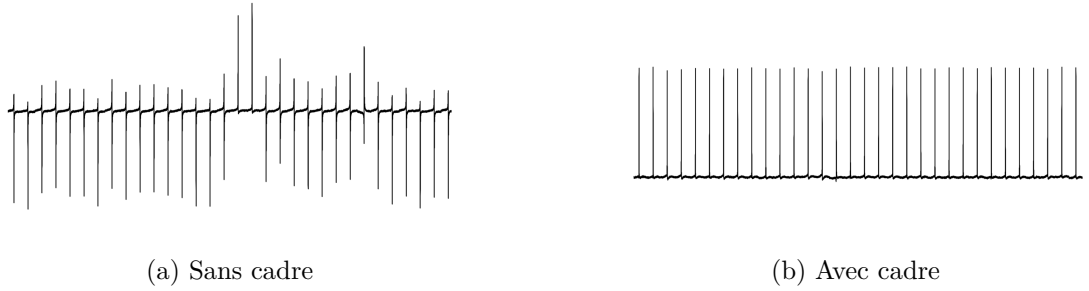


FIGURE II.7.7 – Variations de phase avec et sans cadre stéréotaxique.

Déroulement de l'examen

Un examen dure environ 2h réparties en 15 min de positionnement, 25 min d'image anatomique, 5 min de shim et 2×25 min de spectroscopie de diffusion.

Imagerie

Pour avoir un bon contraste permettant la segmentation de l'hippocampe, une image à pondération T_2 est réalisée. Les paramètres ont été optimisés pour la souris : $TR=2500$ ms, $BW=40$ kHz, taille de la matrice de 256×256 , 4 échos, $TE=12$ ms, $TE_{eff}=24$ ms. L'image finale correspond à la moyenne sur 10 acquisitions. La résolution de l'image obtenue est de $125 \times 125 \mu m^2$ dans le plan et $300 \mu m$ dans la profondeur. Enfin, pour faciliter la segmentation, un zero-filling a été réalisé pour obtenir une matrice 512×512 .

L'hippocampe est segmenté manuellement en utilisant le logiciel BrainVisa.

Spectroscopie RMN de diffusion

Pour les expériences de spectroscopie RMN, on prend un temps d'écho de 40 ms qui permet d'atteindre une pondération en diffusion $b = 2000s/mm^2$. Des impulsions adiabatiques (HS4) de produit temps-bande passante de 20 ont été créées pour la refocalisation. Leur durée est prise égale à 2 ms. Dans ce cas, la bande passante est suffisamment grande (10 kHz) pour négliger les problèmes de déplacement chimique. Enfin, le temps de répétition est 2 s. La contamination maximale C_{max} avec ces paramètres est inférieure à 10%.

Les spectres ont été acquis dans un voxel de taille $2 \times 7.2 \times 2.6 \text{ mm}^3$ (37.44 mm^3) centré sur l'hippocampe (figure II.7.8).

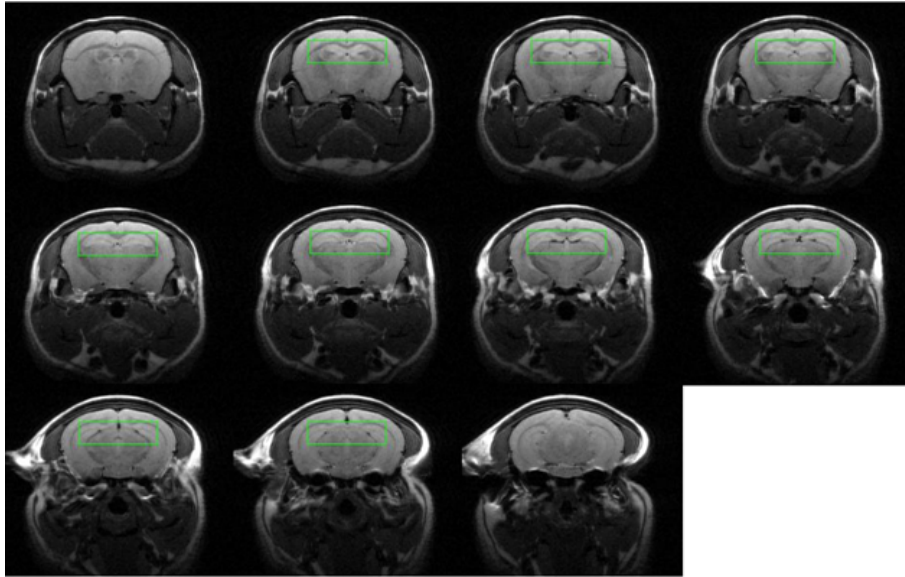


FIGURE II.7.8 – Positionnement d'un voxel dans le cerveau de souris centré sur l'hippocampe pour la spectroscopie RMN de diffusion.

Le temps d'acquisition total est de 25 min pour chaque b , correspondant à 798 acquisitions. Pour éviter les dérives de shim et de température, les acquisitions à $b = 0$ et $b = 2000\text{s/mm}^2$ sont entrelacées.

Les acquisitions sont sommées sans rephasage individuel. Les spectres sont ensuite quantifiés avec LCModel utilisant une base incluant un spectre des macromolécules (3h d'accumulation cumulée en utilisant la méthode d'annulation des métabolites, temps d'inversion égal à 680 ms). L'ADC est calculé pour les métabolites dont les valeurs des Cramér-Rao lower bounds sont inférieures à 5 %, ie N-acétylaspartate (NAA), myo-inositol (Ins), créatine totale (tCr), glutamate (Glu), composés choline (tCho) et taurine (Tau).

7.5 Résultats

7.5.1 Premier temps de mesure

Au premier temps de mesure, les expériences ont été menées sur 20 animaux âgés de 3 mois ((93 ± 2) jours).

Le volume de l'hippocampe a été mesuré à $(19.66 \pm 2.10) \text{ mm}^3$ par segmentation manuelle en utilisant le logiciel BrainVisa. Cette valeur est plus basse que celle mesurée chez les mêmes souris transgéniques âgées de 8 mois (21.73 mm^3) dans une précédente étude (Yang *et al.*, 2011) mais reste dans le bon ordre de grandeur.

Sur certains animaux, l'atrophie cérébrale était déjà visible comme on peut le voir sur la figure II.7.9.

Les spectres des métabolites acquis dans un voxel centré sur l'hippocampe pour un animal sont montrés sur la figure II.7.10. L'utilisation d'un temps d'écho court combiné à une

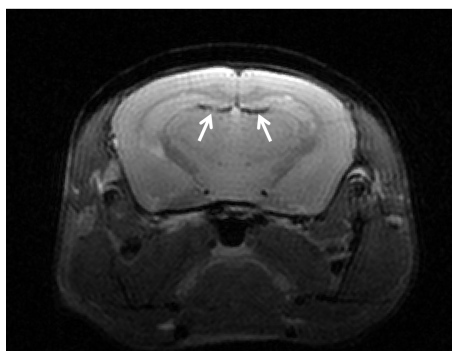


FIGURE II.7.9 – Image de l'atrophie cérébrale d'une souris à l'âge de 3 mois.

séquence de type CPMG qui augmente les temps de relaxation T_2 et diminue la J-modulation permet la quantification (avec et sans pondération en diffusion) de NAA, tCr, tCho, et des métabolites J-couplés, Glu, Ins et Tau.

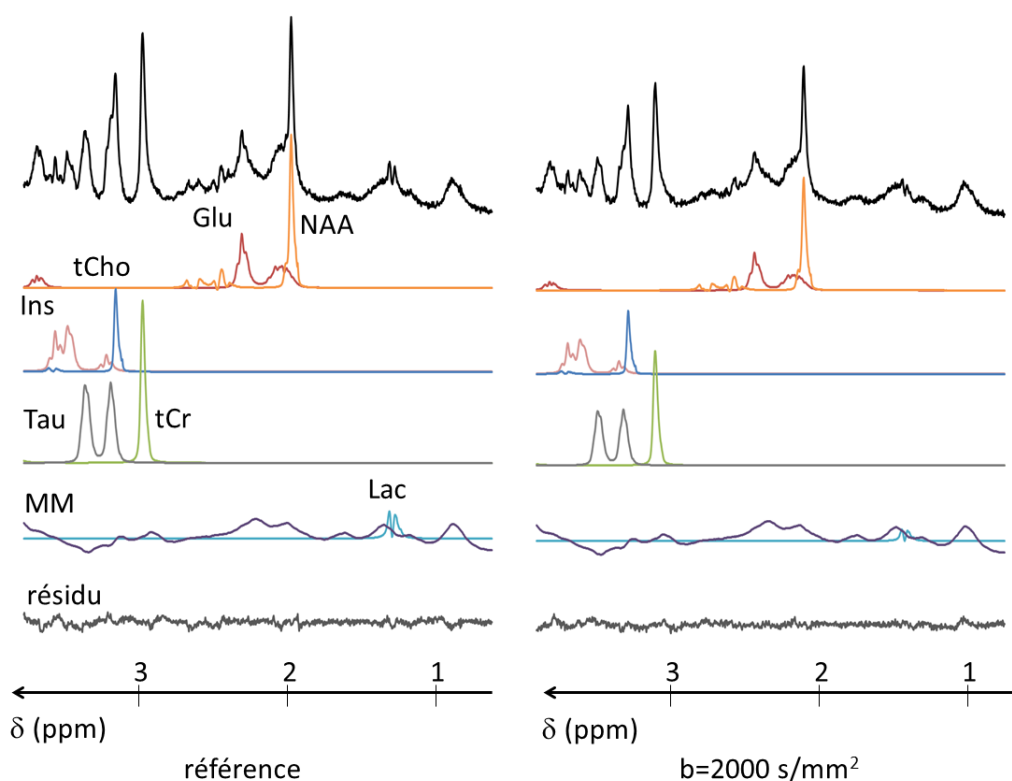


FIGURE II.7.10 – Spectres obtenus au premier temps de mesure pour un animal (764 averages).

La figure II.7.10 montre les décompositions LCModel des spectres à $b=0$ et $b=2000$ s/mm². On constate que l'insertion dans la base du spectre des macromolécules permet un très bon ajustement des spectres (résidu plat).

Néanmoins, les concentrations obtenues avec LCModel pour la quantification des macromolécules sont légèrement différentes pour les deux valeurs de b (environ 15% plus faible avec la pondération en diffusion) alors qu'elles devraient être identiques. En effet, sur des échelles de temps aussi courtes, les macromolécules ne sont pas censées se déplacer. Leur ADC est nul

(i.e. même concentrations avec et sans pondération en diffusion). Pour limiter les biais dans le calcul d'ADC, on corrige les concentrations des métabolites obtenues avec pondération en diffusion de telle sorte que la concentration des macromolécules soit la même dans les deux conditions.

Les valeurs des concentrations et des ADC sont rassemblés dans le tableau II.7.1.

	NAA	tCr	tCho	Glu	Ins	Tau
Concentration (mM)	7.70 ± 0.58	8.00	1.16 ± 0.14	8.05 ± 0.57	6.32 ± 0.73	8.54 ± 0.77
ADC_{Tr} ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$)	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.06 ± 0.04	0.12 ± 0.03

TABLEAU II.7.1 – Concentrations et ADC obtenus pour des souris rTg âgées de 3 mois.

Les valeurs des concentrations sont cohérentes avec la littérature (Yang *et al.*, 2011). De même, les valeurs d'ADC sont du même ordre de grandeur que celles obtenues précédemment dans le cerveau de souris saines (Valette *et al.*, 2012).

7.5.2 Deuxième temps de mesure

Au deuxième point de mesure, les mêmes animaux, âgés de 6 mois ((170 ± 2) jours), ont été soumis aux mêmes examens que précédemment.

Le volume de l'hippocampe a été mesuré à (18.84 ± 1.70) mm³. Le récapitulatif des concentrations et des ADC sont données dans le tableau II.7.2.

	NAA	tCr	tCho	Glu	Ins	Tau
Concentration (mM)	7.42 ± 0.36	8.00	1.29 ± 0.11	7.24 ± 0.63	6.76 ± 0.73	8.11 ± 0.64
ADC_{Tr} ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$)	0.09 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.13 ± 0.03

TABLEAU II.7.2 – Concentrations et ADC obtenus pour des souris rTg âgées de 6 mois.

7.5.3 Troisième temps de mesure

Au moment de la rédaction de ce manuscrit, les expériences du troisième point de mesure n'avaient pas encore débutées. Il ne sera donc pas possible de les présenter ici.

7.6 Discussion

7.6.1 Augmentation importante de la pondération en diffusion

La séquence DW-LASER optimisée offre les mêmes avantages que la séquence DW-LASER initiale (Valette *et al.*, 2012) tout en ayant une pondération en diffusion plus importante. Par rapport à la séquence initiale, le facteur de pondération en diffusion b est augmenté

d'un facteur $2.25 \frac{TE+4\delta}{TE-4\delta}$. Avec les paramètres de notre séquence ($TE=40$ ms et $\delta=1$ ms), cela correspond à une augmentation de 2.75. Cette pondération en diffusion est équivalente à celle qu'on aurait obtenu avec la séquence DW-PRESS (de Graaf *et al.*, 2001). Cependant notre séquence possède en plus les avantages de la séquence LASER (augmentation du temps de relaxation T_2 , diminution de la J-modulation, bonne localisation grâce à l'insensibilité aux inhomogénéités de champ).

Grâce à cette optimisation, il est possible d'augmenter la pondération en diffusion pour avoir des mesures plus précises et plus courtes. De manière symétrique, il est possible de diminuer le temps d'écho en maintenant la pondération en diffusion constante. Cela permet de voir plus de métabolites et est particulièrement intéressant lorsque le signal est faible (petits volumes, voxels profonds...).

7.6.2 Optimisation généralisable à d'autres séquences de diffusion

L'optimisation qui consistait à remplir le temps disponible avec des gradients de diffusion est spécifique à la séquence DW-LASER présentée dans ce travail. Au contraire, l'optimisation des directions orthogonales des gradients possède l'avantage d'être applicable à toutes les séquences de diffusion qui auraient pour but de mesurer la trace du tenseur de diffusion ADC_{Tr} sans modifier le temps de diffusion. Pour augmenter la pondération en diffusion, une étude récente a proposé des directions quasi-orthogonales (1 0 1), (1 1 0) et (1 0 -1) (Kan *et al.*, 2011). Cette combinaison permet de multiplier b par 2 mais avec des gradients effectifs pas exactement orthogonaux (i.e. mesure approchée de ADC_{Tr}). Avec nos directions, le facteur de pondération b est augmenté d'un facteur 2.25 et les directions des gradients sont réellement orthogonales.

7.6.3 Comparaison entre le premier et le deuxième temps de mesure

Volume de l'hippocampe

Malgré le stade très précoce de la maladie, une diminution significative de 4% du volume de l'hippocampe a été observée entre les deux premières mesures.

Aucune normalisation n'ayant été réalisée pour ces mesures, il est possible que l'atrophie observée corresponde à une atrophie globale du cerveau et non pas seulement à une atrophie de l'hippocampe.

Concentrations des métabolites

La spectroscopie RMN est un outil incontournable dans l'étude préclinique des maladies neurodégénératives *in vivo* car elle permet d'obtenir des informations sur la neurochimie de manière non invasive (Choi *et al.*, 2007). La concentration de certains métabolites et leur variation au cours du temps permet d'identifier des biomarqueurs de la neurodégénérescence.

La figure II.7.11 rassemble les résultats des deux premiers temps de mesure. Les concentrations des différents métabolites sont calculées en prenant la créatine totale comme référence interne (8mM) après avoir vérifié que sa concentration était effectivement stable entre les deux mesures. Dans notre étude, on constate que les concentrations des métabolites varient de manière significative :

- -10% pour le glutamate
- +11% pour les composés choline
- +7% pour le myo-inositol
- -5% pour la taurine

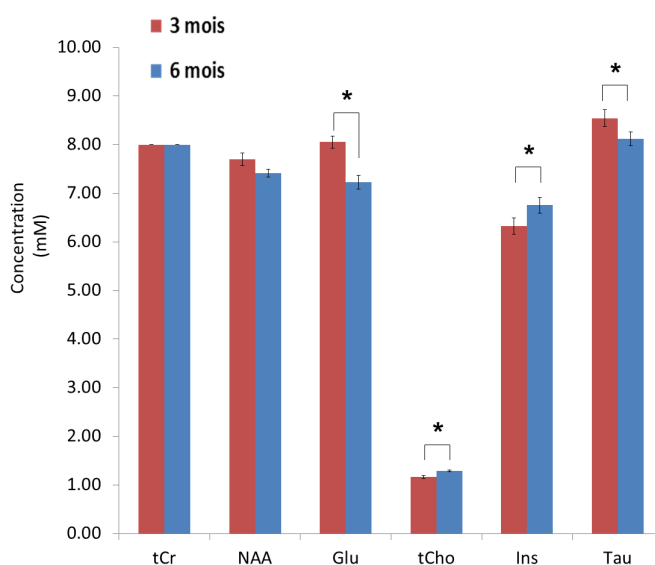


FIGURE II.7.11 – Variation de la concentration des métabolites entre le premier et le deuxième point de mesure. Les tests statistiques entre le premier et le deuxième point de mesure ont été réalisés en utilisant le test de Student par paire : le symbole étoile signifie $p < 0.05$. Les barres d'erreur correspondent aux SEM.

En particulier, l'augmentation des concentrations des métabolites astrocytaires, choline totale et myo-inositol, est importante et présente chez presque tous les animaux pris individuellement (70% et 75% respectivement). Cette augmentation peut être expliquée par l'astrogliose et l'activation de la microglie. Pour notre modèle animal (rTg4510), la réaction astrocytaire a été décrite (Santacruz *et al.* (2005) et Yang *et al.* (2011)). Elle est également présente chez des patients Alzheimer (Gyls *et al.*, 2004) où des variations semblables des concentrations de tCho et Ins ont été observées (Elble *et al.* (1989), Klunk *et al.* (1996), Pettegrew *et al.* (1997)).

Dans les modèles animaux de la maladie Alzheimer, une diminution de concentrations des métabolites neuronaux (NAA et Glu) est souvent observée (Dedeoglu *et al.* (2004), Marjanska *et al.* (2005)). Dans notre étude, on observe bien une diminution importante du glutamate, pouvant être causée par une diminution du métabolisme du glucose (Mosconi, 2005), mais

de manière surprenante celle du NAA est non significative. Ce résultat négatif peut être expliqué par le stade précoce de la neurodégénérescence.

La taurine est l'un des principaux osmolytes (avec le myo-inositol). On lui attribue aussi un rôle de neuroprotection. Dans la plupart des maladies neurodégénératives, la taurine aurait plutôt tendance à augmenter que ce soit dans la maladie de Huntington (Zacharoff *et al.*, 2012) ou dans la maladie d'Alzheimer (Nilsen *et al.*, 2012). Cependant, certaines études rapportent une stabilité de Tau (Forster *et al.*, 2013) ou, comme ici, une diminution (Tkac *et al.*, 2012). L'analyse de ces variations est complexe d'autant plus que, chez les patients Alzheimer, Tau ne peut pas être quantifiée du fait des faibles concentrations de la molécule chez l'homme.

ADC des métabolites

Contrairement à la spectroscopie RMN classique, la spectroscopie RMN de diffusion est relativement peu utilisée dans l'étude de maladies neurodégénératives. Jusqu'à présent, cette technique a plutôt été utilisée pour étudier les ischémies cérébrales (Dreher *et al.* (2001), van der Toorn *et al.* (1996), Zheng *et al.* (2012), Abe *et al.* (2000), Dijkhuizen *et al.* (1999)) et les tumeurs cérébrales (Harada *et al.* (2002), Hakumaki *et al.* (1998)). Dernièrement, une première étude de spectroscopie de diffusion sur une maladie neurologique, la sclérose en plaques, a montré une corrélation entre la diminution de l'ADC du NAA et la sévérité de la maladie (Wood *et al.*, 2012).

Notre étude est la première à réaliser un suivi longitudinal de souris transgéniques en spectroscopie RMN de diffusion.

Comme pour les autres paramètres évalués dans ce projet, les mesures des ADC présentent des variations significatives entre les deux premiers temps de mesure :

- -13% pour le NAA
- -19% pour le glutamate
- +15% pour les composés choline
- +18% pour la créatine totale

L'interprétation de ces résultats se fait en grande partie grâce à la compartimentation cellulaire des métabolites.

Pour les métabolites neuronaux, la diminution de l'ADC peut être la conséquence de l'apparition de lésions tau soluble et donc d'une augmentation de la viscosité dans les neurones. La présence d'agrégats pourrait aussi expliquer cette diminution mais à ce stade précoce de la maladie, l'accumulation de tau insoluble débute tout juste (Santacruz *et al.*, 2005).

Pour les métabolites astrocytaires, les ADC ont tendance à augmenter. Cette augmentation

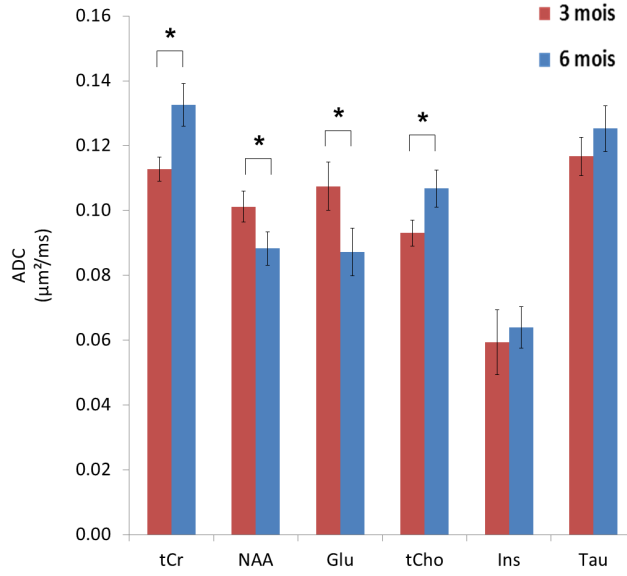


FIGURE II.7.12 – Variation de l'ADC des métabolites entre le premier et le deuxième point de mesure. Les tests statistiques entre le premier et le deuxième point de mesure ont été réalisés en utilisant le test de Student par paire : le symbole étoile signifie $p < 0.05$. Les barres d'erreur correspondent aux SEM.

n'est toutefois significative que pour la choline totale. Ce résultat est cohérent avec l'activation astrocytaire observée chez les souris rTg4510 (Yang *et al.*, 2011) : les astrocytes changent de morphologie avec en particulier une augmentation du diamètre des processus, ce qui a pour conséquence de diminuer la restriction dans les astrocytes et donc d'augmenter les valeurs d'ADC.

Pour la créatine totale, on observe une forte augmentation de l'ADC (présent chez 90% des souris). Ce métabolite étant à la fois présent dans les neurones et les astrocytes, on peut supposer que les phénomènes apparaissant dans les deux types cellulaires se compensent. Pour expliquer cette augmentation, on regardera plutôt du côté du pool énergétique PCr/Cr. En conditions énergétiques normales, la créatine totale se répartie en 1/3 de Cr et 2/3 de PCr (Burklen *et al.*, 2006) mais dans la maladie d'Alzheimer, il est rapporté que la proportion de Cr augmente ce qui implique mécaniquement une augmentation de l'ADC. En effet la créatine étant une molécule plus petite que la phosphocréatine, elle diffuse plus vite. Pour évaluer la conversion PCr \rightarrow Cr de manière plus quantitative, on se reporte à l'équation de Stokes Einstein (4.3). D'après cette formule, le coefficient de diffusion d'une molécule est inversement proportionnel à son rayon hydrodynamique R_H (rayon de la molécule R_M auquel on a ajouté la couche d'hydratation L). Grâce à un développement limité de $1/R_H$ pour $L \ll R_M$, on obtient que D est proportionnel à $(1/R_M - L/R_M^2)$, le dernier terme de l'expression pouvant être considéré comme constant. Enfin en notant M la masse molaire de la molécule, on a R_M proportionnel à $M^{1/3}$, ce qui conduit à une expression du coefficient de diffusion de la forme $D = \alpha M^{-1/3} - \beta$ avec α et β des constantes positives.

Dans le cas de la créatine totale, la masse molaire M correspond à la moyenne pondérée

des masses molaires de la créatine, M_{Cr} , et de la phosphocréatine, M_{PCr} . En prenant x la fraction molaire de PCr, le coefficient de diffusion de la créatine totale s'écrit :

$$D = \alpha((1-x).M_{Cr} + x.M_{PCr})^{-1/3} - \beta \quad (7.14)$$

avec les masses molaires $M_{Cr}=133$, $M_{PCr}=211$

Les constantes α et β sont quant à elles déterminées grâce aux expériences sur fantôme d'eau liquide à 20°C réalisées dans la littérature (Merboldt *et al.* (1993), Ellegood *et al.* (2005), Nicolay *et al.* (1995), Abe *et al.* (2000) Branzoli *et al.* (2013)). Les données sont rassemblées dans le tableau II.7.3.

Molécules	M	D en $\mu\text{m}^2/\text{ms}$				
		Merboldt 1993	Ellegood 2005	Nicolay 1995	Abe 2000	Branzoli 2013
NAA	174	0.85	0.68	0.61	0.65	-
Cr	133	-	0.79	0.80	0.85	0.96
PCr	211	0.80	-	-	-	0.68
Cho	105	1.30	0.97	0.94	1.05	-
		$\alpha=11.9$	$\alpha=8.8$	$\alpha=10.1$	$\alpha=12.2$	$\alpha=9.91$
		$\beta=1.2$	$\beta=0.9$	$\beta=1.2$	$\beta=1.5$	$\beta=0.99$

TABLEAU II.7.3 – Détermination de α et β par corrélation linéaire entre le coefficient de diffusion libre D et la racine cubique de la masse molaire $M^{-1/3}$.

En appliquant la formule (7.14) avec les coefficients $\alpha=10.6$ et $\beta=1.2$, obtenus en moyennant les données de la littérature, on déduit les coefficients de diffusion libre dans l'eau à 20°C : $D(\text{Cr})=0.88 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ et $D(\text{PCr})=0.58 \mu\text{m}^2/\text{ms}$. En supposant que la restriction et la viscosité restent globalement les mêmes entre les deux temps de mesure, une augmentation de 18% de l'ADC de tCr correspondrait à une inversion des proportions PCr/Cr ($2/3 \rightarrow 0.26$).

Notons toutefois que les valeurs des ratios PCr/Cr en conditions normales varient beaucoup selon la zone du cerveau, l'animal considéré et la méthode de mesure.

7.7 Conclusions et perspectives

Cette étude est la première à suivre un modèle animal de maladie neurodégénérative en utilisant les techniques de spectroscopie RMN de diffusion.

Pour réaliser ce suivi, nous avons optimisé une séquence de spectroscopie RMN de diffusion pour mesurer de faibles variations d'ADC en minimisant les biais (mouvement, anisotropie, termes croisés...). Parmi les améliorations apportées à la séquence originale, l'optimisation des directions des gradients pour maximiser la pondération en diffusion est généralisable et pourra être utilisée pour d'autres séquences de diffusion visant à acquérir la trace du tenseur de diffusion.

L'utilisation de cette séquence a permis de mesurer des différences significatives entre les deux premiers temps de mesure, que ce soit au niveau des concentrations ou des ADC.

Les variations des concentrations sont conformes avec la plupart des études de spectroscopie réalisées sur des modèles souris de la maladie d'Alzheimer. Seule la taurine a un comportement en contradiction avec nos attentes. Cependant, il faut garder à l'esprit que les variations de concentrations sont très dépendantes des modèles animaux utilisés (Tkac *et al.*, 2012).

Concernant les ADC, les résultats sont cohérents avec les changements de structures décrits dans la littérature. Les mesures de diffusion apportent des informations complémentaires à celles obtenues avec les concentrations et particulièrement pertinentes dans le cas de la neurodégénérescence où les maladies sont de plus en plus décrites comme des maladies à inclusions intracellulaires.

Finalement, au même titre que la spectroscopie RMN et la volumétrie, la spectroscopie RMN de diffusion apparaît comme une technique prometteuse pour le suivi longitudinal de modèles animaux de maladies neurodégénératives et pour identifier de nouveaux biomarqueurs de la neurodégénérescence.

Troisième partie

Spectroscopie RMN du phosphore ^{31}P

Développement d'une séquence de localisation en spectroscopie ^{31}P .

La spectroscopie RMN du phosphore, bien que beaucoup moins sensible que la spectroscopie du proton, présente de nombreux avantages. Pour commencer, elle permet de visualiser et de quantifier les métabolites phosphorylés qui sont directement impliqués dans le métabolisme énergétique. Nous citerons à titre d'exemple, l'ATP qui constitue la principale source d'énergie de l'organisme, la phosphocréatine qui est un tampon énergétique (elle permet de maintenir la concentration d'ATP disponible constante) et le phosphate inorganique Pi qui est le substrat de la réaction de synthèse de l'ATP. En plus de la quantification, les spectres ^{31}P donnent un accès unique à des paramètres dynamiques. Par exemple, il est possible de mesurer la vitesse de synthèse d'ATP en faisant une expérience de transfert de saturation (Lei *et al.*, 2003b). L'ATP est en équilibre permanent avec le phosphate inorganique (équation (8.1)).



En saturant un pic de l'ATP, le pic du Pi est atténué à une vitesse qui dépend de la constante de vitesse $k_{\text{Pi} \rightarrow \text{ATP}}$. Un autre exemple de paramètre mesuré grâce à la spectroscopie RMN ^{31}P est la valeur du pH intracellulaire. Le pH peut être déterminé en mesurant les légères variations de déplacement chimique du phosphate inorganique. Ce paramètre est un reflet de l'état énergétique des cellules et a récemment été mis en évidence comme un possible biomarqueur de la neurodégénérescence (Chaumeil *et al.*, 2012).

Pour mesurer la vitesse de synthèse d'ATP (V_{ATP}) et la valeur du pH sur les modèles de maladies neurodégénératives disponibles à MIRCen, nous avons travaillé sur le développement méthodologique de séquences spectroscopiques en ^{31}P qui serviront ensuite à acquérir des spectres ^{31}P *in vivo*.

Chez l'homme, des études de spectroscopie RMN ^{31}P ont été réalisées avec pour seule loca-

lisation, l'utilisation d'antenne de surface (Lei *et al.* (2003a), Du *et al.* (2007) et Du *et al.* (2008)). Dans notre cas, ce type de localisation n'est pas possible. D'une part, chez les animaux, et les macaques en particulier, le crâne est recouvert d'une épaisse couche musculaire, extrêmement riche en composés phosphorylés, qui contamine le signal issu du cerveau, d'autre part, pour faire des mesures plus spécifiques, les zones à observer peuvent être profondes telles que le striatum. Cela est visible sur l'image T_2^* réalisée avec une antenne de surface ^1H de la figure III.8.1, où l'on remarque l'importance du muscle autour du crâne mais aussi la proportion du signal qu'il représente lorsque l'on utilise une antenne de surface (zone en hypersignal).

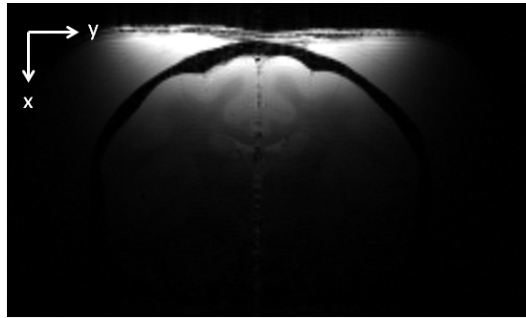


FIGURE III.8.1 – Image T_2^* réalisée avec une antenne de surface.

Si les séquences de localisation en spectroscopie ^{31}P ne sont pas systématiquement utilisées, c'est parce que leur développement se heurte à plusieurs problèmes : la faible sensibilité du phosphore, les temps de relaxation T_2 extrêmement courts et enfin, les erreurs de déplacement chimique.

Dans la littérature, deux séquences ont été proposées pour tenter de répondre à ces problématiques : la séquence ISIS et la séquence OVS. Actuellement, la séquence la plus utilisée est la séquence ISIS. Cependant, il n'est pas sûr que cette séquence soit la plus adaptée à notre contexte expérimental.

Dans ce chapitre, nous allons donc comparer les deux séquences pour déterminer qu'elle est la meilleure pour réaliser des mesures de pH cérébral (et à l'avenir des mesures de vitesse de synthèse d'ATP) chez le primate sur le système 7T de MIRCen.

Dans un premier temps, nous exposons les principes des deux séquences, leurs avantages et leurs inconvénients puis leur efficacité est évaluée *in vitro* et enfin des mesures de pH *in vivo* sont réalisées sur des macaques sains.

8.1 Contraintes de la spectroscopie RMN du phosphore ^{31}P

8.1.1 Sensibilité du ^{31}P

Les composés phosphorylés sont à peu près dans les mêmes concentrations que les métabolites observables en spectroscopie RMN du proton. Néanmoins leur détection est plus difficile du

fait de la faible sensibilité du phosphore. En effet la sensibilité varie, comme le signal sur bruit, en γ^2 . Pour le phosphore, γ est environ 2.5 fois plus faible ($\gamma/2\pi = 17.235$ MHz/T), ce qui correspond à un rapport 6 en termes de sensibilité.

8.1.2 Relaxation du ^{31}P

Les temps de relaxation T_2 pour le phosphore 31 sont très courts, environ 10 ms à 7T (Lei *et al.*, 2003a), ce qui rend les pertes dues à la relaxation importantes. Il ne faut donc pas que l'aimantation reste trop longtemps dans le plan transverse. Toutes les séquences d'écho de spin sont donc rejetées. Au contraire, les séquences ISIS et OVS, qui n'utilisent les impulsions 90° que lors de l'acquisition, sont de bonnes candidates pour la localisation en phosphore.

8.1.3 Artéfact de déplacement chimique

Un dernier critère important pour le choix de séquences de localisation en ^{31}P est l'artéfact de déplacement chimique (phénomène décrit dans le chapitre 3).

Ce point est critique en phosphore car la largeur du spectre est grande mais aussi car un décalage du voxel peut conduire à une contamination du signal importante si le voxel décalé contient du muscle, très riche en composés phosphorylés et biaiser la mesure de V_{ATP} à cause de la pollution glycolytique (figure III.8.2).

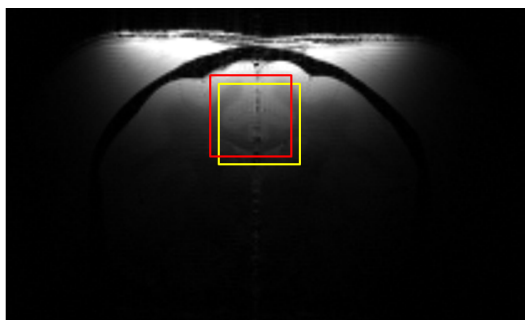


FIGURE III.8.2 – Artéfact de déplacement chimique.

Pour limiter les risques de contamination, on se fixe d'avoir une erreur de déplacement chimique environ égale à 10%.

Dans nos études en spectroscopie ^{31}P , seuls quelques pics du spectre nous intéressent : dans le sens des fréquences décroissantes, le pic du phosphate inorganique, Pi , le pic de la phosphocréatine, PCr , et, dans l'objectif de mesurer V_{ATP} , le pic de ATP_γ .

La largeur spectrale est d'environ 8 ppm, ce qui revient à un écart fréquentiel d'environ 1000 Hz à 7T. Pour avoir une erreur de déplacement chimique de 10%, les impulsions doivent donc avoir une bande passante supérieure à 10 kHz (voir chapitre 3 pour le détail du calcul).

8.1.4 Contexte expérimental

Comme cela est traditionnellement le cas pour les études du métabolisme énergétique réalisées au sein de l'équipe (Boumezbeur *et al.* (2004), Boumezbeur *et al.* (2005), Valette *et al.* (2008), Chaumeil *et al.* (2009)), les études de spectroscopie ^{31}P se feront chez le primate et non chez le rongeur. Pour ces expériences, le système 7T Varian de MIRCen est donc utilisé en configuration primate avec des gradients atteignant 100 mT/m sur chaque axe.

La localisation et le positionnement du voxel sont réalisés en utilisant une antenne ^1H Helholtz. Pour les expériences *in vivo*, le shim se fait en ^1H grâce à FASTMAP. Sur fantôme, la solution est suffisamment concentrée pour faire le shim en phosphore.

Pour les acquisitions phosphore, une antenne de surface en quadrature (Rapid Biomed) est utilisée. Elle permet d'avoir un champ moyen de 3 kHz, soit environ 2 fois supérieur à une antenne simple boucle également disponible au laboratoire.

8.2 Développement d'une séquence de localisation

8.2.1 Séquence de localisation ISIS

Principe

La séquence ISIS (Image Selected *In vivo* Spectroscopy) est une séquence nécessitant plusieurs répétitions (2^n où n est la dimension) qui emploie des impulsions radiofréquence d'inversion, allumées ou éteintes, en présence de gradient de sélection de coupe (Ordidge *et al.*, 1986). Pour chaque répétition, lorsqu'une impulsion est allumée, l'aimantation sélectionnée par le gradient est inversée. A la fin de chaque répétition, l'aimantation est donc soit alignée selon B_0 , soit alignée selon $-B_0$, suivant qu'elle a vu ou non les impulsions radiofréquence. L'excitation n'est effectuée qu'après cette série d'impulsions d'inversion et le signal est acquis immédiatement après l'excitation. Au bout de 2^n acquisitions, il est alors possible de reconstruire le signal issu uniquement de la zone sélectionnée par combinaisons linéaires des différentes acquisitions : le signal issu du volume d'intérêt est additionné de manière cohérente alors que le signal venant de l'extérieur est détruit.

Pour isoler le signal d'un voxel, on utilise la séquence ISIS 3D qui se compose de $2^3 = 8$ acquisitions représentées sur la figure III.8.3.

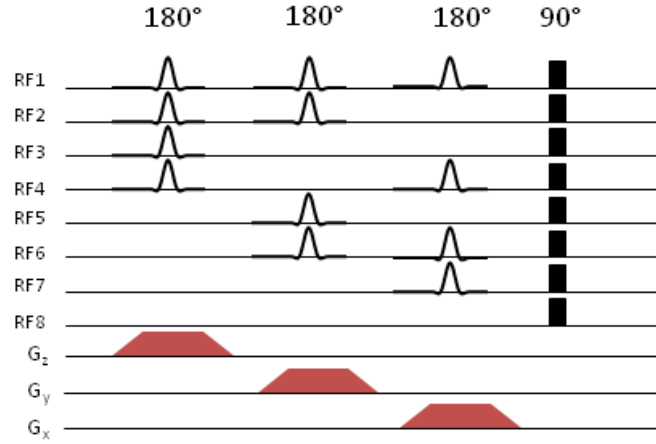


FIGURE III.8.3 – Séquence de localisation ISIS 3D.

La reconstruction du signal localisé se fait par combinaison linéaire des différentes acquisitions :

$$\Sigma_i = -RF_1 + RF_2 - RF_3 + RF_4 - RF_5 + RF_6 - RF_7 + RF_8 \quad (8.2)$$

Cette formule permet de conserver uniquement le signal issu du voxel sélectionné par les impulsions radiofréquence sélectives. Ce volume correspond à l'intersection de trois plans orthogonaux définis par les gradients G_x , G_y et G_z .

Avantages

- Utilisation d'impulsions d'inversion adiabatiques qui offre une localisation adiabatique.
- Chaque acquisition (RF_i) est très courte. Cela permet d'avoir une relaxation du Pi négligeable lors des mesures de vitesse de synthèse d'ATP par transfert de saturation, où la saturation se trouve avant le bloc de localisation.

Inconvénients

- La séquence nécessite des temps de répétition longs pour avoir une relaxation complète du signal et ainsi pouvoir reconstruire le signal en appliquant la formule (8.2).
- Si les impulsions sont rallongées, les pertes par relaxation T_2 pendant les impulsions peuvent devenir non négligeables et l'erreur de déplacement chimique augmente.

Paramètres de la séquence ISIS

Pour nos expériences, les inversions se font avec une impulsion adiabatique HS4, $R=20$. Leurs durées dans les trois directions x , y , z sont identiques et égales à 2.5 ms (soit $BW=8$ kHz). Pour avoir une relaxation complète et donc pour avoir une bonne reconstruction du signal, on prend un long temps de répétition égal à 8 s. De plus, le nombre d'acquisition devra être un multiple de 8 pour que la localisation soit effective et que l'on puisse appliquer la formule (8.2).

8.2.2 Séquence de localisation OVS

Principe

Le principe de la séquence OVS (Outer Volume Suppression) est de supprimer l'aimantation à l'extérieur du volume d'intérêt, sans toucher à l'aimantation intérieure. Après suppression, le signal restant est excité par l'application d'une impulsion 90° .

Pour supprimer le signal extérieur, son aimantation doit être basculée dans le plan transverse puis déphasée par l'application d'un gradient (spoiler). Le module OVS est représenté sur la figure III.8.4. Dans un bloc de suppression, le schéma excitation-déphasage est appliqué trois fois, dans les trois directions de l'espace (x,y,z) pour exciter l'ensemble du volume extérieur. Dans les directions y et z, les impulsions utilisées sont des impulsions bi-bandes qui excitent deux plans parallèles simultanément. Dans la direction x, qui correspond à la direction de la profondeur (orthogonale à l'antenne), la puissance à envoyer en surface sera très inférieure à celle nécessaire en profondeur. Dans ces conditions, il est difficile d'optimiser une impulsion bi-bande. On remplace donc l'impulsion bi-bande par deux impulsions simple bande. En contrepartie, le temps du module OVS sera rallongé.

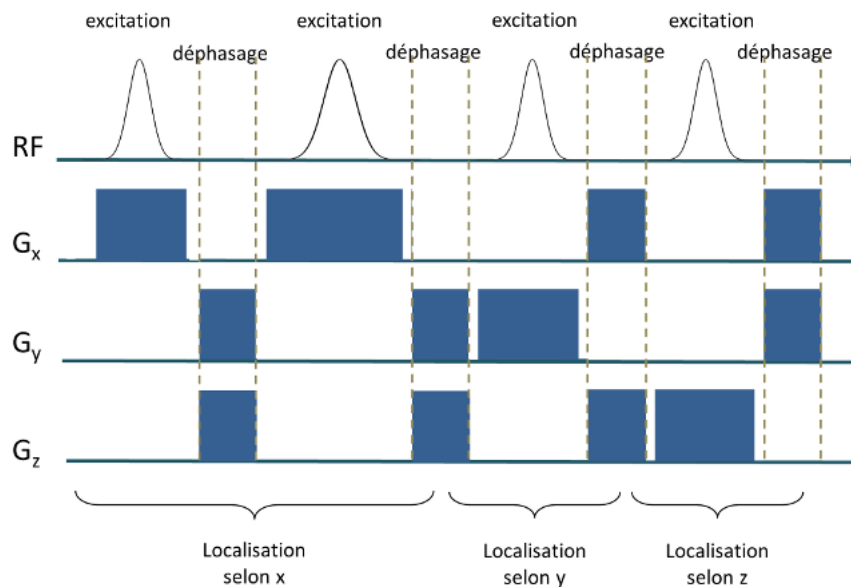


FIGURE III.8.4 – Module OVS.

Si le champ de l'antenne était homogène, un seul module OVS serait suffisant. Cependant, ce n'est pas le cas en général et particulièrement avec les antennes de surface. En pratique, il faut répéter autant de fois que nécessaire le schéma excitation-déphasage du module OVS en augmentant progressivement la puissance des impulsions. Ce module de suppression est appelé BISTRO (B_1 InSensitive TRain to Obliterate signal) (Luo *et al.*, 2001). Il est représenté sur la figure III.8.5 où chaque module OVS est représenté en rouge.

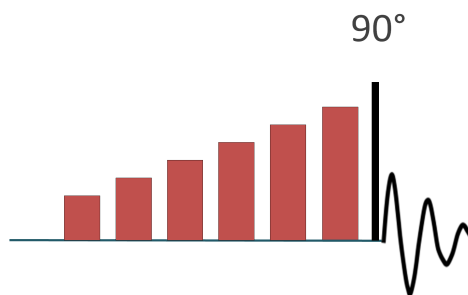


FIGURE III.8.5 – Séquence OVS. Chaque rectangle rouge correspond à un module OVS. La puissance des blocs augmente selon la fonction sécante hyperbolique.

La puissance des impulsions évolue comme la fonction sécante hyperbolique ($\text{sech}=1/\cosh$). Enfin le module BISTRO est suivi d'une impulsion broad-pulse (impulsion carrée) qui excite de manière non sélective les spins non saturés.

Avantages

- Temps d'écho nul ce qui permet de limiter les pertes par relaxation T_2 . L'aimantation issue du voxel reste parallèle à \vec{B}_0 dans le volume d'intérêt tout le temps de la localisation.
- Puissance radiofréquence de pointe (B_{1max}) nécessaire moins grande que si on réalisait des inversions.
- Impulsions plus courtes, car pas besoin de faire d'inversion, ce qui diminuent l'erreur de déplacement chimique.

Inconvénients

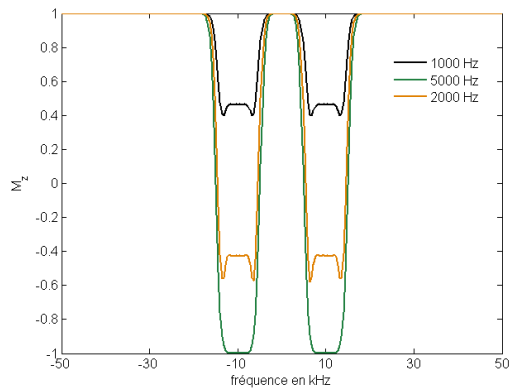
- Durée de localisation qui peut être longue car il faut plusieurs modules OVS pour supprimer le volume extérieur. On ne pourra pas négliger la relaxation du Pi dans les expériences de transfert de saturation.

Paramètres de la séquence OVS

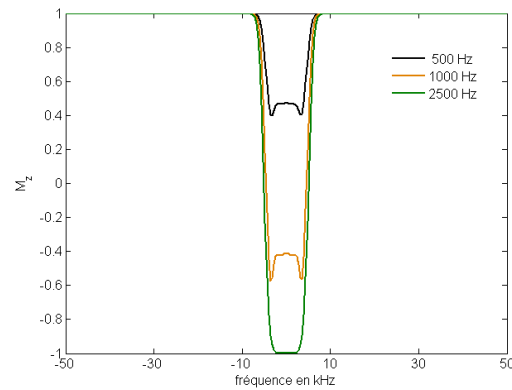
Pour réaliser la saturation du volume extérieur, l'impulsion HS4, $R=20$ a été utilisée pour la direction x.

Dans les autres directions, cette même impulsion a été utilisée pour générer des impulsions bi-bandes de type Hadamard. La construction d'impulsions multifréquence se fait en appliquant la propriété suivante : l'ajout d'une phase linéaire à une impulsion permet d'obtenir une nouvelle impulsion identique décalée en fréquence par rapport à l'originale. Cette impulsion a pour effet d'exciter une bande décalée par rapport au zéro de l'IRM. Les impulsions Hadamard bi-bandes sont donc obtenues en additionnant deux impulsions décalées en fréquence pour sélectionner deux bandes simultanément.

Pour la séquence OVS, nous n'utilisons pas les impulsions adiabatiques pour leur insensibilité aux inhomogénéités de champ mais car elles ont le même profil fréquentiel très nets et la même bande passante élevée quelle que soit la valeur du champ B_1 et même dans le cas des OVS quand la condition d'adiabaticité n'est pas respectée (figure 8.6(b)). On vérifie en simulant les équations de Bloch que cette propriété reste vraie avec une impulsion bi-bande construite à partir d'une impulsion adiabatique HS4, $R=20$ (figure 8.6(a)).



(a) Impulsion Hadamard bi-bande construite avec des impulsions HS4, $R=20$.



(b) Impulsion HS4, $R=20$.

FIGURE III.8.6 – Profils fréquentiels des impulsions utilisées dans la séquence OVS pour différentes valeurs de champ B_1 .

En pratique, pour avoir des bandes de largeur x et espacées de Δx , le décalage en fréquence à appliquer est donné par le produit $R/T_p \times \Delta x/x$ où T_p et R sont relatifs à l'impulsion adiabatique utilisée (figure III.8.7).

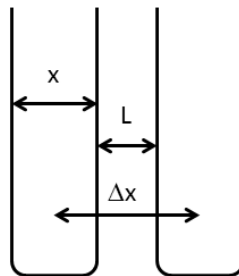


FIGURE III.8.7 – Définition des constantes utiles pour la constructions des impulsions Hadamard.

Pour la direction y , nous avons généré une impulsion bi-bandes dont la largeur des bandes de saturation est la même que la largeur du voxel ($\Delta x/x=2$). Dans la direction z où la masse musculaire est plus importante, nous avons généré une impulsion avec des bandes plus larges relativement à la taille du voxel ($\Delta x/x=1.8$). Les impulsions bi-bandes ont pour durée 2 ms

dans les directions y et z.

Dans la direction x, qui est la direction orthogonale à l'antenne, l'impulsion pour la saturation proche de l'antenne a une durée courte, 1 ms, alors que l'impulsion pour la saturation lointaine a une durée longue de 2.8 ms. Les largeurs des bandes de saturation ont été optimisées dans cette direction pour maximiser le signal sur bruit. Les valeurs optimales retenues sont 1 cm près de l'antenne et 2 cm loin de l'antenne.

La durée des spoilers est 4 ms. Pour avoir une bonne suppression du volume extérieur, au moins six modules OVS sont nécessaires. Au total, la localisation OVS dure donc 142.8 ms. Enfin, l'excitation se fait par l'application d'une impulsion carrée ("hard pulse") de 45 μ s.

Contrairement à la séquence ISIS, il n'existe aucune contrainte sur le temps de répétition. On choisira donc le TR permettant le signal optimal pour le Pi. Les simulations de Bloch en présence de réactions chimiques montrent qu'il est en général plus favorable de prendre un temps de répétition court. Pour notre séquence, on prendra donc TR=1.6 s. On vérifiera expérimentalement que cette valeur conduit à la meilleure quantification du Pi.

8.3 Détermination de la meilleure séquence de localisation

8.3.1 Validation de la localisation sur fantôme ^{31}P

Matériel et méthodes

Pour vérifier la bonne localisation des séquences ISIS et OVS, on réalise un fantôme de triphosphosphate qui permet d'acquérir des profils directement en phosphore. La concentration de la solution est prise égale à 400 mM (soit environ 100 fois supérieure à celle *in vivo*) ce qui permet de shimmer directement en phosphore et de raccourcir les temps d'acquisition. Le triphosphosphate possède trois groupements phosphate, ce qui se traduit sur le spectre RMN par trois pics (figure III.8.8). Pour éviter les problèmes de contamination et avoir des profils nets et bien séparés, on centre nos acquisitions sur le pic le plus isolé (à environ 1700 Hz des deux résonances principales) et on prend une bande passante d'acquisition de 2500 Hz.

Avec ce fantôme, le champ de vue de l'antenne est relativement réduit. Pour voir les effets de la localisation, nous avons pris comme taille de voxel 5 mm, 15 mm et 10 mm dans les directions x, y et z respectivement. De plus, pour diminuer les temps d'acquisition, la localisation n'est réalisée que dans une dimension à chaque fois. En pratique, les dimensions orthogonales au profil ont été choisies très grandes (100 mm).

Les paramètres d'acquisition sont identiques pour les deux séquences :

- Temps d'acquisition d'environ 8 min 30 s soit 64 répétitions pour la séquence ISIS et 320 pour la séquence OVS

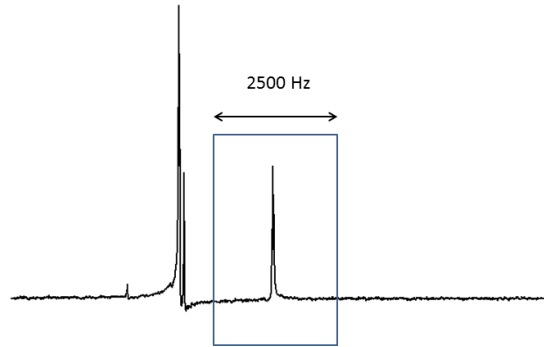


FIGURE III.8.8 – Spectre du tripolyphosphate et représentation de la bande passante d'acquisition utilisée pour les profils.

- Bande passante d'acquisition de 2500 Hz
- Champ de vue de 300 mm
- 256 points d'acquisition

Résultats

Les profils acquis dans les directions x, y et z sont présentés sur les figures III.8.9, III.8.10 et III.8.11 respectivement. Afin de comparer les deux séquences, les profils localisés ont été normalisés par leur valeur maximale. L'effet de la localisation a été évalué en superposant le profil sans localisation (en orange) aux profils localisés (en noir). Notons que dans les figures qui suivent, le profil non localisé est à la même échelle que le spectre localisé OVS ce qui permet d'avoir une estimation des pertes liées à la localisation. Pour la séquence ISIS, nous n'avons pas acquis de profils sans localisation car la reconstruction, qui est faite automatiquement lors de l'enregistrement, n'est valable qu'en présence des impulsions 180° (cf formule (8.2)).

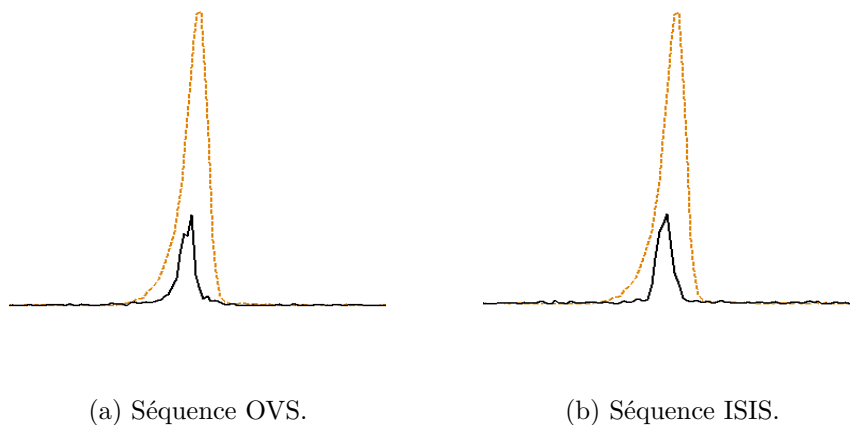


FIGURE III.8.9 – Comparaison des profils selon x obtenus avec la séquence OVS 8.9(a) et la séquence ISIS 8.9(b).

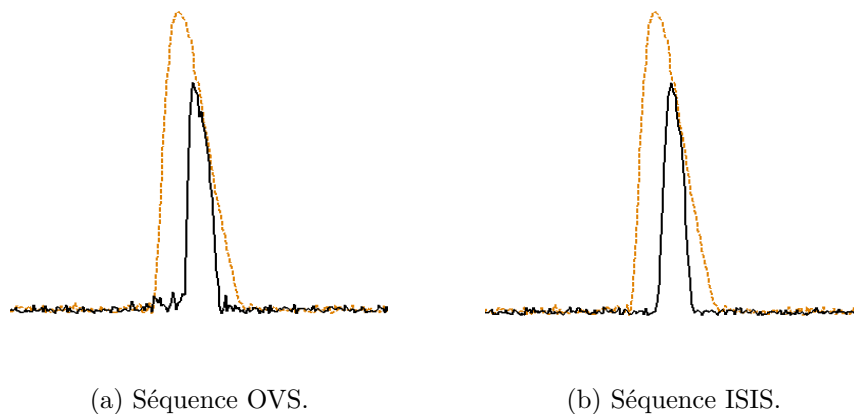


FIGURE III.8.10 – Comparaison des profils selon y obtenus avec la séquence OVS 8.10(a) et la séquence ISIS 8.10(b).

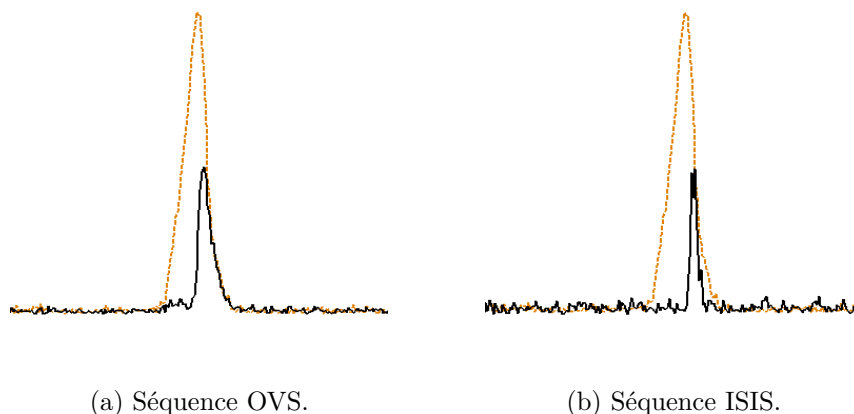


FIGURE III.8.11 – Comparaison des profils selon z obtenus avec la séquence OVS 8.11(a) et la séquence ISIS 8.11(b).

Sur les figures III.8.9, III.8.10 et III.8.11, on vérifie que la localisation a bien été réalisée dans les trois directions de l'espace pour les séquences OVS et ISIS. D'une manière générale, les profils obtenus avec la séquence ISIS sont un peu plus nets qu'avec les OVS. Pour le signal sur bruit, il n'y a pas de grandes différences entre les deux localisations ce qui ne permet pas de privilégier une séquence plutôt que l'autre.

En ce qui concerne les pertes lors de la localisation OVS, on remarque qu'elles sont très faibles et inquantifiables dans les directions y et z . Dans la direction x , où les bandes de saturation ont été rallongées, elles sont plus importantes (environ 40%).

Discussion

Finalement, les expériences sur fantôme de tripolyphosphate ont permis de vérifier la bonne localisation réalisée par les deux séquences. Cependant, les profils obtenus ne permettent pas de conclure de manière catégorique sur la meilleure séquence. Notre choix définitif se fera en

comparant le signal sur bruit des spectres *in vivo*.

Sur les profils OVS, on constate que les pertes dues à la localisation sont très faibles dans toutes les directions exceptée x. Cependant, dans cette direction, il faut noter que le champ de vue de l'antenne était particulièrement réduit et qu'il a fallu diminuer la taille du voxel à 5 mm. Dans cette situation, les profils des impulsions selon x se recouvrent en partie, ce qui conduit à une perte de signal (figure III.8.12). Pour des voxels plus grands, ce problème ne devrait plus apparaître et les pertes seront certainement du même ordre de grandeur que dans les autres directions.

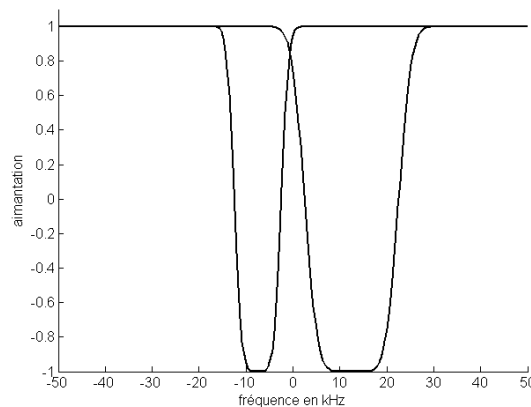


FIGURE III.8.12 – Profil fréquentiel effectif selon x pour un voxel de taille 5 mm.

Enfin, mis à part l'efficacité de la localisation, la séquence OVS présente un avantage sur la séquence ISIS car elle limite l'erreur de déplacement chimique grâce à des impulsions plus courtes. Pour un spectre allant de Pi à ATP_γ (environ 8 ppm), l'erreur est de 10% pour les OVS au lieu de 12.5% pour la séquence ISIS. Seule la direction x a une erreur de déplacement chimique plus grande pour les OVS pour le bas du voxel (13.5%). Par chance, il s'agit de la zone de l'espace où la contribution au signal est extrêmement faible.

8.3.2 Comparaison des spectres localisés *in vivo*

Le choix de la séquence de localisation se fait en comparant les spectres obtenus dans un voxel localisé sur le striatum. En effet, par la suite, les mesures de pH seront réalisées dans cette structure du cerveau.

Matériel et méthodes

Expérimentation animale

Cette étude a été réalisée sur un macaque mâle sain (poids 4.8 kg). L'ensemble des procédures a été conduit en accord avec les recommandations de l'union européenne (86/609/EEC) pour l'usage des animaux de laboratoire et conformément aux réglementations éthiques du ministère français de l'agriculture et des forêts.

L'induction de l'anesthésie est réalisée par injection intramusculaire d'un mélange de kétamine (15 mg/kg) et de xylazine (1.5 mg/kg). L'animal est ensuite positionné dans un cadre stéréotaxique constitué de barres d'oreilles et d'un mors. Enfin, l'anesthésie est prolongée par injection en intraveineuse continue de propofol ($200\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) pour la suite de l'examen. Ce type d'anesthésie présente entre autre l'avantage de pouvoir être régulé en temps réel par ajustement du débit.

L'animal est suivi durant toute la session de spectroscopie grâce au système de monitoring Maglife. Différents paramètres physiologiques sont suivis et maintenus dans leur gamme physiologique :

- La température, mesurée par sonde rectale, est maintenue autour de 36°C grâce un système d'air chaud.
- La pression non invasive moyenne (PNI), mesurée à l'aide d'un brassard, reste comprise entre 40 et 60 mmHg.
- La fréquence respiratoire est de l'ordre de 30 respirations par minute.
- La pression partielle de CO_2 expiré vaut environ 25 mmHg.

Le temps total d'anesthésie n'excède pas 4h.

Paramètres de séquence

Une image de localisation T_2^* a été réalisée pour positionner un voxel de 10.5 mL ($15 \times 35 \times 20 \text{ mm}^3$) localisé dans le striatum (voir figure III.8.13).

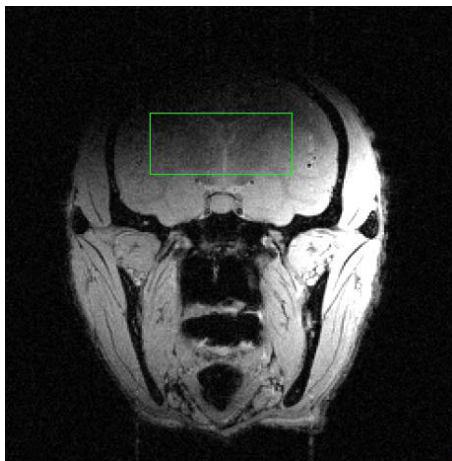


FIGURE III.8.13 – Localisation du voxel striatal.

Comme on peut le voir sur la figure III.8.13, le striatum est une structure profonde du cerveau. Chez le macaque, il se trouve à peu près au centre du cerveau ce qui est critique pour nos acquisitions en terme de signal.

Les spectres ^{31}P ont été obtenus en 16 minutes d'acquisition avec les deux séquences soit 600 répétitions pour OVS et 120 pour ISIS.

Résultats

Comme le montre la figure III.8.16, les spectres obtenus dans le striatum en seulement 16 minutes sont assez bien résolus et permettent de bien identifier les pics du phosphate inorganique Pi et de la phosphocréatine PCr.

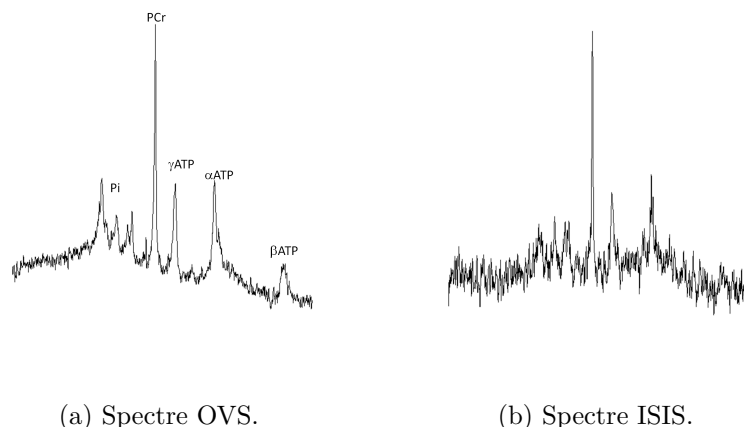


FIGURE III.8.14 – Comparaison des spectres localisés dans le striatum obtenus avec la séquence OVS 8.14(a) et la séquence ISIS 8.14(b) ($lb=20$ Hz).

Immédiatement, on constate néanmoins que le signal sur bruit du spectre obtenu avec la séquence OVS est bien supérieur à celui du spectre ISIS. Quantitativement, on le mesure 2.5 plus élevé pour la séquence OVS ($SNR = 27$ pour ISIS et 67 pour OVS).

Discussion

Finalement, la séquence OVS permet d'obtenir un meilleur signal sur bruit que la séquence ISIS et permet aussi de limiter l'erreur de déplacement chimique grâce à l'utilisation d'impulsions plus courtes. Dans les expériences de mesure de pH, nous utiliserons donc cette séquence pour réaliser la localisation.

8.4 Mesure de pH *in vivo*

Pendant cette thèse, nous avons utilisé la séquence de localisation OVS pour réaliser des mesures de pH chez le macaque.

Le pH étant le reflet de l'état énergétique des cellules, les altérations du métabolisme énergétique présentes dans les maladies neurodégénératives vont donc *a priori* avoir des conséquences sur ce paramètre. Ainsi des variations du pH ont été reportées dans la maladie de Parkinson (Rango *et al.*, 2005), de Huntington et d'Alzheimer (Mandal *et al.*, 2012) et récemment le pH a été identifié comme un biomarqueur précoce de la maladie de Huntington précédant l'apparition de lésions visibles en histologie et en imagerie RMN (Chaumeil *et al.*, 2012). Dans cette dernière étude, réalisée dans notre équipe, la mesure de pH se faisait dans

l'ensemble du cerveau de rats 3NP (modèle de maladie de Huntington). Le passage au macaque va permettre de réaliser des mesures localisées dans le striatum qui est une structure atteinte très tôt dans l'évolution de la maladie.

Dans cette partie, nous présentons les résultats préliminaires qui valident la mesure de pH dans le striatum d'un macaque sain. Cette mesure sera ensuite intégrée dans un projet du laboratoire suivant des macaques 3NP.

8.4.1 Théorie

En spectroscopie du phosphore 31, la plupart des métabolites existent sous leur forme protonée et déprotonée ce qui rend la fréquence de résonance très dépendante du pH. Considérons la réaction acido-basique entre l'acide HA et la base A⁻.



Les deux espèces chimiques ont des fréquences de résonance proches mais malgré tout différentes. La fréquence de résonance de HA est appelée ν_{HA} et celle de A⁻ ν_{A} . En pratique, quand l'équilibre est établi et l'échange rapide, on ne voit qu'une seule fréquence : la fréquence de résonance du couple acido-basique qui correspond à la moyenne pondérée des fréquences. En notant x_{A} la fraction molaire de A, on a :

$$\nu = x_{\text{A}} \cdot \nu_{\text{A}} + (1 - x_{\text{A}}) \cdot \nu_{\text{HA}} \quad (8.4)$$

Par définition, le pH vaut :

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{x_{\text{A}}}{1 - x_{\text{A}}} \right) \quad (8.5)$$

En utilisant la formule 8.4, on peut exprimer le pH en fonction des fréquences de résonances.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{\nu - \nu_{\text{HA}}}{\nu_{\text{A}} - \nu} \right) \quad (8.6)$$

Et enfin en fonction du déplacement chimique :

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{\delta - \delta_{\text{HA}}}{\delta_{\text{A}} - \delta} \right) \quad (8.7)$$

Pour mesurer le pH dans les conditions physiologiques, et être sensible à de faibles variations, il faut utiliser un couple acido-basique dont le pKa est très proche du pH intracellulaire (i.e. pH \sim 7). En effet, dans la zone du pKa, une petite variation de pH est reliée à une modification de l'équilibre chimique relativement importante et donc à un déplacement en fréquence qui peut être observable en spectroscopie RMN.

En spectroscopie RMN du phosphore ^{31}P , on utilise le couple acido-basique du phosphate inorganique Pi : $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ dont le pK_a vaut 6.77. Pour calculer les variations de déplacement chimique de Pi, on utilisera comme référence le pic de la phosphocréatine (PCr). Cette molécule possède deux avantages : être insensible aux variations de pH (ce qui est une condition obligatoire pour servir de référence) et être la résonance la plus importante des spectres ^{31}P . Les déplacements chimiques des formes acide et basique du Pi par rapport à PCr sont $\delta_{\text{HA}}=3.23$ ppm et $\delta_{\text{A}}=5.70$ ppm.

Finalement, connaissant pK_a , δ_{HA} et δ_{A} du couple $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, une simple mesure du déplacement chimique δ de Pi par rapport à PCr permet d'obtenir le pH intracellulaire.

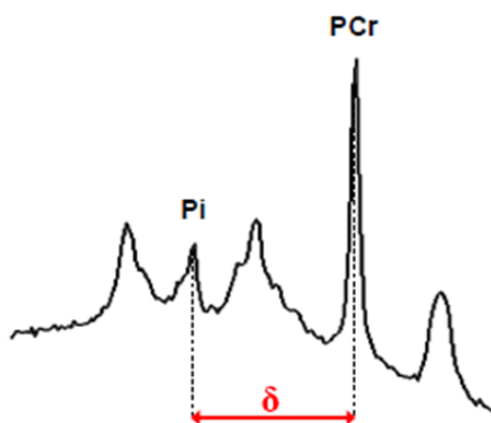


FIGURE III.8.15 – Principe de la mesure du pH intracérébral.

La difficulté de la mesure réside dans la détection et la quantification précise du pic du Pi. En effet, ce pic est assez petit et se trouve entouré de nombreux autres métabolites.

8.4.2 Matériel et méthodes

Expérimentation animale

La validation de la mesure du pH striatal a été réalisée sur un macaque mâle sain de 4.8 kg. Les procédures et le suivi physiologique de l'animal sont identiques à ceux de la partie précédente.

Paramètres de séquence

Les spectres ^{31}P ont été acquis dans un voxel striatal de 10.5 mL (figure III.8.13) en utilisant la séquence de localisation OVS décrite précédemment. Le temps d'acquisition est de 14 minutes soit 520 répétitions.

Analyses des spectres par jMRUI

L'analyse des spectres a été réalisée en utilisant le logiciel libre jMRUI avec la méthode d'analyse AMARES. Cette méthode est basée sur un algorithme non linéaire de moindres carrés dans le domaine temporel (Vanhamme *et al.*, 1997). Elle utilise des conditions définies *a priori* par l'expérimentateur : les valeurs de départ (*starting values*), les contraintes sur les résonances (*prior knowledges*) et contraintes sur la phase et l'apodisation (*overall phases*).

Starting values

Avant de lancer l'analyse, il faut identifier les métabolites à quantifier. Pour chaque métabolite, on définit de manière approximative sa fréquence de résonance (delta) et sa largeur à mi-hauteur (LW). Ces valeurs seront utilisées comme point de départ des itérations.

Les résonances considérées pour l'ajustement de nos spectres sont données dans le tableau III.8.1 avec leur abréviation, leur multiplicité et leur déplacement chimique donné dans la littérature. Concernant les largeurs à mi-hauteur, elles sont initialisées sur le spectre (LW comprises entre 8 et 60 Hz).

Métabolites	Abréviation	Multiplicité	δ (ppm)
Phosphoéтанолamine	PE	S	6.8
Phosphosérine	PSer	S	6.49
Phosphocholine	PC	S	6.2
2,3-diphosphoglycérate	DPG	D	5.23 ; 5.71
Phosphate inorganique	Pi	S	4.8
Glycophosphoéтанолamine	GPE	S	3.5
Phospholipides membranaires	GPC	S	2.9
Phosphocréatine	PCr	S	0
Adénosine Triphosphate γ	ATP $_{\gamma}$	D	-2.38 ; -2.68
Adénosine Triphosphate α	ATP $_{\alpha}$	D	-7.33 ; -7.71
Nicotinamide Adenine Dinucléotide	NAD	S	-8.37
Adénosine Triphosphate β	ATP $_{\beta}$	T	-16.03 ; -16.26 ; -16.49

TABLEAU III.8.1 – Métabolites de la base de quantification jMRUI (S = singulet, D = doublet, T = triplet)

Prior Knowledges

Dans l'algorithme, plusieurs paramètres concernant les résonances peuvent être contraints :

- leur forme (lorentzienne ou gaussienne)
- leur fréquence
- leur largeur à mi-hauteur
- leur amplitude
- leur phase

Hormis la forme des raies, les contraintes peuvent être définies de 5 manières. Le paramètre peut être :

- Complètement libre.
- Imposé à une valeur fixe.
- Imposé dans une gamme de valeurs (*soft constraint*).
- Fixé par rapport à une autre résonance (homothétie et/ou translation).
- Imposé dans une gamme de valeurs en rapport avec une autre résonance (paramètre d'un autre pic \pm marge d'erreur).

Dans le choix des *prior knowledges*, l'idée est de trouver un compromis entre la liberté qu'on laisse à l'algorithme et les contraintes qu'on lui impose. Si l'algorithme est trop libre, il arrivera toujours à converger mais le résultat sera la plupart du temps physiquement aberrant. Au contraire, les contraintes trop fortes donneront un résultat conforme à la chimie de l'échantillon mais ne permettront pas de mesurer de faibles variations de fréquence et d'amplitude. De plus, du fait de la variabilité des spectres, les contraintes qui s'appliquent à un spectre ne s'appliqueront pas forcément à un autre.

Pour l'optimisation de l'analyse AMARES, nous avons donc essayé de contraindre l'algorithme au minimum pour que l'ajustement soit bon (résidu faible), conforme à la réalité, et surtout reproductible.

Pour tous nos ajustements, les raies ont été prises lorentziennes, les fréquences ont été imposées aux fréquences trouvées dans la littérature à 0.5 ppm près et toutes les largeurs à mi-hauteur ont été bornées à 60 Hz pour éviter les ajustements aberrants.

Les pics d'intérêts (Pi et PCr) ont été rephasés "à la main" en appliquant une phase linéaire. Ainsi, la phase relative des résonances à gauche de la PCr ($\delta > 0$) est prise égale à zéro. Pour les autres résonances qui n'ont pas été rephasées ($\delta < 0$), on laisse ce paramètre libre.

Des contraintes supplémentaires ont été nécessaires pour rendre compte des couplages dans les multiplets :

- Les largeurs à mi-hauteur des pics constituant un multiplet sont identiques, de sorte que les amplitudes vérifient directement la règle du triangle de Pascal (1:1 pour les doublets et 1:2:1 pour les triplets).
- Les écarts fréquentiels entre les pics sont quant à eux pris égaux aux constantes de couplage J données dans la littérature (Hamilton *et al.*, 2003) :

- γ -ATP : 15.86 Hz
- α -ATP : 19.25 Hz
- β -ATP : 11.47 Hz
- DPG : 24.3 Hz

Overall phases

Dans cette partie, on s'intéresse au spectre dans son ensemble : phases d'ordre zero et un et apodisation de la FID.

Les spectres ayant été rephasés à la main, on laisse une petite marge pour la phase d'ordre zéro ($\pm 10^\circ$) et on fixe arbitrairement la phase d'ordre un à zéro.

Les spectres acquis possèdent une ligne de base qui correspond à la contamination osseuse. Cette contribution a des temps de relaxation T_2 très courts et disparaît en ôtant les trois premiers points de la FID.

8.4.3 Résultats

La quantification par jMRUI a permis de mesurer avec précision le décalage fréquentiel entre Pi et PCr. En particulier, dans la zone du Pi où beaucoup de résonances coexistent, le résidu est très plat. On notera toutefois un artéfact à la fréquence centrale du spectre vers 1 ppm. Pour éviter que cette résonance ne perturbe notre quantification, on prendra comme fréquence centrale du spectre la fréquence de la PCr décalée de 150 Hz. L'artéfact se trouve alors dans une zone ne contenant aucune résonance.

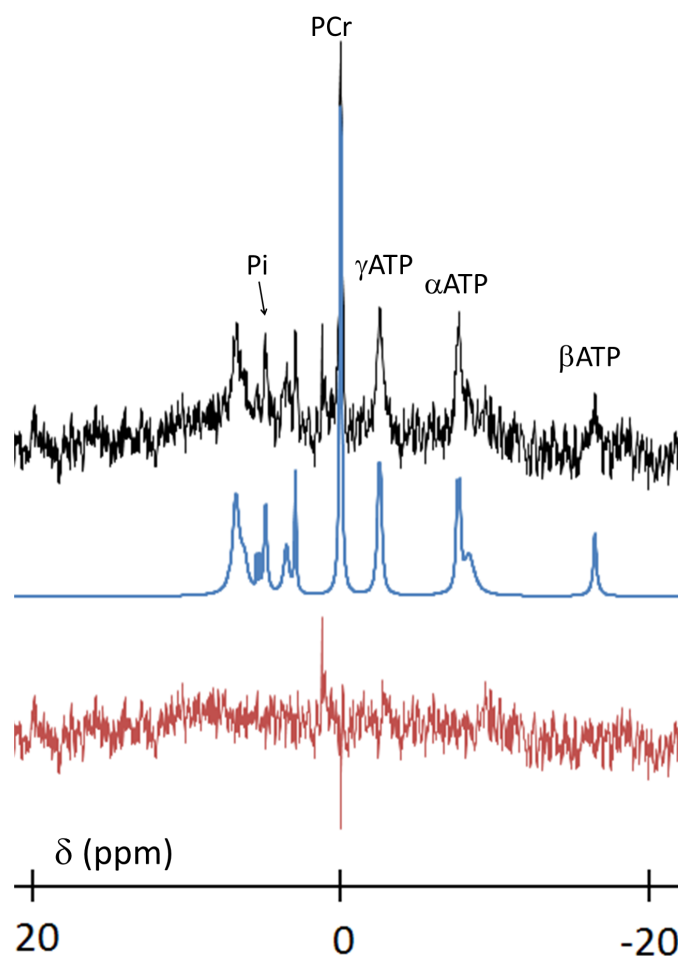


FIGURE III.8.16 – Ajustement jMRUI d'un spectre ^{31}P obtenu en 13 min avec la séquence OVS dans le striatum de macaque ($\text{lb}=10$ Hz).

Pour évaluer la précision de nos mesures, six spectres ^{31}P ont été acquis sur le même animal pendant la même session de spectroscopie. La valeur moyenne du pH a été mesurée à 7.05 avec un écart type de 0.01.

Concernant les valeurs de pH obtenues dans ces expériences, elles sont assez proches de celles obtenues chez l'homme dans de précédentes études (Rango *et al.* (2005), Chaumeil *et al.* (2012), Mandal *et al.* (2012)). De plus la précision de nos mesures permet en théorie de mesurer des variations de pH de l'ordre 0.4% telles que celles observées entre des patients Huntington et des patients contrôles (Chaumeil *et al.*, 2012).

8.5 Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons optimisé deux séquences de localisation en phosphore 31. Au cours d'expériences sur fantôme puis *in vivo*, il nous est apparu que la séquence de localisation OVS était supérieure à la séquence ISIS en terme de signal sur bruit et de déplacement chimique pour acquérir des spectres dans des structures profondes du cerveau de primate. Cette séquence a donc été utilisée pour réaliser l'acquisition de spectres localisés dans le striatum. Les spectres obtenus en seulement 13 min ont permis de mesurer le pH avec une grande précision. Le pH ayant récemment été identifié comme un biomarqueur de la maladie de Huntington (Chaumeil *et al.*, 2012), notre séquence sera donc prochainement utilisée pour mesurer le pH dans un modèle phénotypique de la maladie de Huntington chez le macaque (intoxication chronique à l'acide 3 nitropropionique).

Au cours de cette thèse, des expériences de transfert de saturation ont également été réalisées dans le but de mesurer la vitesse de synthèse d'ATP dans le cerveau de macaque en une seule session RMN. Pour cela, une longue impulsion de saturation (1 à 2 s) saturant spécifiquement le pic d'ATP $_{\gamma}$ a été ajoutée devant le module de localisation OVS. De telles mesures avaient été réalisées par notre équipe sur un système RMN 3T où le manque de sensibilité avait été compensé en sommant 27 expériences (Chaumeil *et al.*, 2009). Le passage à un champ de 7 Tesla permettait d'envisager des mesures plus rapides. Malheureusement, la sensibilité de nos mesures s'est avérée décevante, sans doute à cause des très longs câbles entre l'antenne et les préamplificateurs. La quantification du Pi, déjà difficile dans les conditions classiques d'acquisition, s'est alors révélée quasi impossible après saturation par manque de signal. La mesure de V_{ATP} n'a donc pas pu être réalisée avant la fin de ma thèse.

Néanmoins, malgré les difficultés rencontrées, le travail de développement méthodologique pour la mesure de V_{ATP} n'a pas été abandonné et plusieurs pistes d'améliorations sont envisagées au laboratoire pour gagner le signal qui faisait défaut à mes expériences. Pour commencer, un autre type de localisation est en réflexion. Contrairement à la mesure du pH, la mesure de V_{ATP} pourrait se faire de manière acceptable sur l'ensemble du cerveau. Avec

une localisation classique, le signal est acquis dans un voxel dont la forme n'est pas représentative des structures anatomiques. Dans nos expériences préliminaires de mesure de V_{ATP} , le volume de localisation était pris comme le plus grand volume parallélépipédique contenu dans le cerveau. Le voxel était donc non spécifique, mais pour autant, une grande partie du cerveau en était exclue. Notre idée est de récupérer le signal du cerveau entier. La mesure n'en sera pas moins spécifique mais le volume d'acquisition sera fortement augmenté. Dans cet objectif, une séquence d'OVS "en casque" est en cours de développement au laboratoire pour acquérir le signal du cerveau entier en supprimant le signal des muscles. Le gain en terme de volume, et donc de signal sur bruit, est estimé de l'ordre de 6.

En parallèle, des préamplificateurs sont en ce moment en préparation pour gagner jusqu'à un facteur 2 en signal sur bruit.

Finalement, l'ensemble de ces améliorations conduiront à une augmentation conséquente du signal sur bruit et permettront certainement de réaliser des mesures de vitesse de synthèse d'ATP en des temps raisonnables.

Quatrième partie

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

L'objectif de cette thèse était de développer de nouvelles séquences de spectroscopie RMN sur le système 7 Tesla de MIRCen pour étudier le milieu intracellulaire *in vivo*. Ce travail s'est décomposé en deux grandes parties : la spectroscopie RMN de diffusion pour explorer et caractériser le milieu intracellulaire et la spectroscopie du phosphore ^{31}P pour l'étude du métabolisme énergétique.

Dans la première partie, nous avons d'abord essayé de déterminer l'influence des différents paramètres impliqués dans le mouvement des métabolites sur les mesures d'ADC. Pour ce faire, nous avons développé une séquence de spectroscopie de diffusion à court temps de diffusion permettant de mesurer la dépendance de l'ADC en fonction du temps de diffusion et ainsi de lever l'indétermination sur la mesure d'ADC. L'étude réalisée sur le rat a été la première observation *in vivo* de la diffusion anormale des métabolites endogènes dans les cellules du cerveau d'un mammifère. Nos mesures ont montré une variation d'ADC caractéristique d'une transition entre un régime de diffusion "libre" et un régime de diffusion "restreint". Cette observation n'a de plus pas fait apparaître de contribution importante des transports actifs et permet donc de rejeter l'hypothèse largement répandue du rôle primordial des courants cytoplasmiques dans le mouvement des métabolites. Le déplacement des métabolites peut alors être exclusivement décrit par le phénomène de diffusion encombrée. Grâce à des modèles analytiques de restriction implémentés pendant cette thèse, nous avons alors pu évaluer de manière quantitative la viscosité du cytoplasme et la distance caractéristique de restriction à courte échelle démontrant ainsi la sensibilité de la spectroscopie RMN de diffusion aux changements de viscosité et d'encombrement. La spectroscopie de diffusion à temps de diffusion courts apparaît donc comme une technique prometteuse pour les maladies neurodégénératives qui sont caractérisées par l'accumulation de protéines, que ce soit sous forme soluble (entraînant potentiellement une augmentation de la viscosité) ou sous forme

d'agrégats (augmentation de l'encombrement).

Pendant ma thèse, une collaboration avec les laboratoires pharmaceutiques Eli Lilly a été mise en place pour évaluer le potentiel thérapeutique de cette technologie dans la maladie d'Alzheimer. Le projet consistait à utiliser la spectroscopie de diffusion à court temps de diffusion pour suivre des souris transgéniques, modèle de taupathie, à un stade précoce de la maladie. Pour être sensible à de faibles variations d'ADC dues aux changements morphologiques reportés dans la littérature, nous avons optimisé la pondération en diffusion d'une séquence de diffusion LASER (Valette *et al.*, 2012) qui permet de mesurer la trace du tenseur de diffusion en un seul coup en limitant la contribution des termes croisés. Pour cela, des gradients ont été introduits pendant le temps libre de la séquence et les directions des gradients ont été optimisées pour maximiser leur amplitude. Les directions obtenues $((-0.5 \ 1 \ 1), (1 \ -0.5 \ 1), (1 \ 1 \ -0.5))$ pourront être utilisées dans d'autres séquences de diffusion ayant pour objectif la mesure de la trace du tenseur de diffusion.

Cette séquence a finalement été utilisée pour suivre les souris transgéniques à l'âge de 3 et 6 mois. Les résultats obtenus à 3 mois d'écart montrent des différences significatives pour les ADC de la plupart des métabolites suggérant que la mesure de diffusion à court temps de diffusion peut être utilisée comme un biomarqueur précoce de la neurodégénérescence.

Dans la deuxième partie, une séquence de localisation OVS en spectroscopie du phosphore 31 a été développée pour mesurer le pH dans le striatum de singe et, à terme, mesurer la vitesse de synthèse d'ATP dans le cerveau entier. Une méthode de quantification utilisant le logiciel libre jMRUI a également été mise au point pour analyser les spectres *in vivo*. Les premières expériences sont très encourageantes et ont permis de mesurer le pH avec une grande précision. Elles permettent d'envisager l'utilisation de cette technique pour évaluer l'utilité potentielle du pH comme biomarqueur de la neurodégénérescence dans un modèle phénotypique de la maladie de Huntington chez le macaque (intoxication chronique à l'acide 3 nitropropionique). Par ailleurs, ce travail a permis de poser les bases pour de futurs développements méthodologiques tels que la mesure de la vitesse de synthèse d'ATP.

En conclusion, cette thèse a permis de répondre à des questions fondamentales sur les mécanismes de transport dans les cellules grâce à la caractérisation de la diffusion anormale dans le cerveau. De plus, l'intérêt de la spectroscopie de diffusion a été démontré pour l'étude de la neurodégénérescence à un stade débutant.

Parmi les outils développés pendant cette thèse, la séquence DW-LASER, qui mesure la trace du tenseur de diffusion en un seul coup, est désormais utilisée en routine chez le rongeur et la localisation OVS pour la spectroscopie du phosphore est en cours d'amélioration pour réaliser des mesures de vitesse de synthèse d'ATP chez le primate.

Cinquième partie

Bibliographie

Bibliographie

- Abe, O, Okubo, T, Hayashi, N, Saito, N, Iriguchi, N, Shirouzu, I, Kojima, Y, Masumoto, T, Ohtomo, K, & Sasaki, Y. 2000. Temporal changes of the apparent diffusion coefficients of water and metabolites in rats with hemispheric infarction: experimental study of transhemispheric diaschisis in the contralateral hemisphere at 7 tesla. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **20**(4), 726–735. PMID: 10779017.
- Agutter, P S, Malone, P C, & Wheatley, D N. 1995. Intracellular transport mechanisms: a critique of diffusion theory. *Journal of Theoretical Biology*, **176**(2), 261–272. PMID: 7475114.
- Alexander, A L, Tsuruda, J S, & Parker, D L. 1997. Elimination of eddy current artifacts in diffusion-weighted echo-planar images: the use of bipolar gradients. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **38**(6), 1016–1021. PMID: 9402204.
- Assaf, Y, & Cohen, Y. 1998. In vivo and in vitro bi-exponential diffusion of N-acetyl aspartate (NAA) in rat brain: a potential structural probe? *NMR in biomedicine*, **11**(2), 67–74. PMID: 9608590.
- Axelrod, D, Koppel, D E, Schlessinger, J, Elson, E, & Webb, W W. 1976. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical journal*, **16**(9), 1055–1069. PMID: 786399.
- Barak, L S, & Webb, W W. 1982. Diffusion of low density lipoprotein-receptor complex on human fibroblasts. *The Journal of cell biology*, **95**(3), 846–852. PMID: 6296157.

- Birken, D L, & Oldendorf, W H. 1989. N-acetyl-L-aspartic acid: a literature review of a compound prominent in ^1H -NMR spectroscopic studies of brain. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **13**(1), 23–31. PMID: 2671831.
- Boumezbeur, Fawzi, Besret, Laurent, Valette, Julien, Vaufrey, Françoise, Henry, Pierre-Gilles, Slavov, Velislav, Giacomini, Eric, Hantraye, Philippe, Bloch, Gilles, & Lebon, Vincent. 2004. NMR measurement of brain oxidative metabolism in monkeys using ^{13}C -labeled glucose without a ^{13}C radiofrequency channel. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **52**(1), 33–40. PMID: 15236364.
- Boumezbeur, Fawzi, Besret, Laurent, Valette, Julien, Gregoire, Marie-Claude, Delzescaux, Thierry, Maroy, Renaud, Vaufrey, Françoise, Gervais, Philippe, Hantraye, Philippe, Bloch, Gilles, & Lebon, Vincent. 2005. Glycolysis versus TCA cycle in the primate brain as measured by combining ^{18}F -FDG PET and ^{13}C -NMR. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **25**(11), 1418–1423. PMID: 15917749.
- Branzoli, Francesca, Techawiboonwong, Aranee, Kan, Hermien, Webb, Andrew, & Ronen, Itamar. 2013. Functional diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy of the human primary visual cortex at 7 T. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **69**(2), 303–309. PMID: 23165888.
- Burklen, Tanja S., Schlattner, Uwe, Homayouni, Ramin, Gough, Kathleen, Rak, Margaret, Szeghalmi, Adriana, & Wallimann, Theo. 2006. The Creatine Kinase/Creatine Connection to Alzheimer's Disease: CK Inactivation, APP-CK Complexes, and Focal Creatine Deposits. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2006**. PMID: 17047305 PMCID: PMC1510941.
- Burri, R, Steffen, C, & Herschkowitz, N. 1991. N-acetyl-L-aspartate is a major source of acetyl groups for lipid synthesis during rat brain development. *Developmental neuroscience*, **13**(6), 403–411. PMID: 1809557.
- Chaumeil, Myriam M, Valette, Julien, Guillermier, Martine, Brouillet, Emmanuel, Boumezbeur, Fawzi, Herard, Anne-Sophie, Bloch, Gilles, Hantraye, Philippe, & Lebon, Vincent. 2009. Multimodal neuroimaging provides a highly consistent picture of energy metabolism, validating ^{31}P MRS for measuring brain ATP synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**(10), 3988–3993. PMID: 19234118.
- Chaumeil, Myriam M, Valette, Julien, Baligand, Céline, Brouillet, Emmanuel, Hantraye, Philippe, Bloch, Gilles, Gaura, Véronique, Rialland, Amandine, Krystkowiak, Pierre, Verny,

- Christophe, Damier, Philippe, Remy, Philippe, Bachoud-Levi, Anne-Catherine, Carlier, Pierre, & Lebon, Vincent. 2012. pH as a biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease: a translational rodent-human MRS study. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **32**(5), 771–779. PMID: 22373643.
- Choi, Ji-Kyung, Dedeoglu, Alpaslan, & Jenkins, Bruce G. 2007. Application of MRS to mouse models of neurodegenerative illness. *NMR in Biomedicine*, **20**(3), 216–237.
- Clarke, D D, Greenfield, S, Dicker, E, Tirri, L J, & Ronan, E J. 1975. A relationship of N-acetylaspartate biosynthesis to neuronal protein synthesis. *Journal of neurochemistry*, **24**(3), 479–485. PMID: 1113123.
- Colvin, Daniel C, Jourquin, Jerome, Xu, Junzhong, Does, Mark D, Estrada, Lourdes, & Gore, John C. 2011. Effects of intracellular organelles on the apparent diffusion coefficient of water molecules in cultured human embryonic kidney cells. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **65**(3), 796–801. PMID: 21337411.
- de Graaf, Robin A., van Kranenburg, Arnaud, & Nicolay, Klaas. 2000. In Vivo ³¹P-NMR Diffusion Spectroscopy of ATP and Phosphocreatine in Rat Skeletal Muscle. *Biophysical Journal*, **78**(4), 1657–1664.
- de Graaf, Robin A., Braun, Kees, & Nicolay, Klaas. 2001. Single-shot diffusion trace ¹H NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, **45**(5), 741–748.
- de Graaf, Robin A, Brown, Peter B, McIntyre, Scott, Nixon, Terence W, Behar, Kevin L, & Rothman, Douglas L. 2006. High magnetic field water and metabolite proton T1 and T2 relaxation in rat brain in vivo. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **56**(2), 386–394. PMID: 16767752.
- Dedeoglu, Alpaslan, Choi, Ji-Kyung, Cormier, Kerry, Kowall, Neil W, & Jenkins, Bruce G. 2004. Magnetic resonance spectroscopic analysis of Alzheimer's disease mouse brain that express mutant human APP shows altered neurochemical profile. *Brain research*, **1012**(1-2), 60–65. PMID: 15158161.
- Dijkhuizen, R M, de Graaf, R A, Tulleken, K A, & Nicolay, K. 1999. Changes in the diffusion of water and intracellular metabolites after excitotoxic injury and global ischemia in neonatal rat brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **19**(3), 341–349. PMID: 10078886.

- Does, Mark D, Parsons, Edward C, & Gore, John C. 2003. Oscillating gradient measurements of water diffusion in normal and globally ischemic rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **49**(2), 206–215. PMID: 12541239.
- Dreher, W, Busch, E, & Leibfritz, D. 2001. Changes in apparent diffusion coefficients of metabolites in rat brain after middle cerebral artery occlusion measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **45**(3), 383–389. PMID: 11241694.
- Du, Fei, Zhu, Xiao-Hong, Qiao, Hongyan, Zhang, Xiaoliang, & Chen, Wei. 2007. Efficient in vivo ³¹P magnetization transfer approach for noninvasively determining multiple kinetic parameters and metabolic fluxes of ATP metabolism in the human brain. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **57**(1), 103–114. PMID: 17191226.
- Du, Fei, Zhu, Xiao-Hong, Zhang, Yi, Friedman, Michael, Zhang, Nanyin, Ugurbil, Kamil, & Chen, Wei. 2008. Tightly coupled brain activity and cerebral ATP metabolic rate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(17), 6409–6414. PMID: 18443293.
- Elble, Rodger, Giacobini, Ezio, & Higgins, Constance. 1989. Choline levels are increased in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Neurobiology of Aging*, **10**(1), 45–50.
- Ellegood, Jacob, Hanstock, Chris C, & Beaulieu, Christian. 2005. Trace apparent diffusion coefficients of metabolites in human brain using diffusion weighted magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **53**(5), 1025–1032. PMID: 15844150.
- Ellegood, Jacob, Hanstock, Chris C, & Beaulieu, Christian. 2006. Diffusion tensor spectroscopy (DTS) of human brain. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **55**(1), 1–8. PMID: 16342152.
- Ellegood, Jacob, Hanstock, Chris C, & Beaulieu, Christian. 2011. Considerations for measuring the fractional anisotropy of metabolites with diffusion tensor spectroscopy. *NMR in biomedicine*, **24**(3), 270–280. PMID: 20925126.
- Forster, Duncan, Davies, Karen, & Williams, Steve. 2013. Magnetic resonance spectroscopy in vivo of neurochemicals in a transgenic model of Alzheimer's disease: A longitudinal study

- of metabolites, relaxation time, and behavioral analysis in TASTPM and wild-type mice. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **69**(4), 944–955. PMID: 22760762.
- Garwood, M, & DelaBarre, L. 2001. The return of the frequency sweep: designing adiabatic pulses for contemporary NMR. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif.: 1997)*, **153**(2), 155–177. PMID: 11740891.
- Gylys, Karen Hoppens, Fein, Jeffrey A, Yang, Fusheng, Wiley, Dorothy J, Miller, Carol A, & Cole, Gregory M. 2004. Synaptic changes in Alzheimer's disease: increased amyloid-beta and gliosis in surviving terminals is accompanied by decreased PSD-95 fluorescence. *The American journal of pathology*, **165**(5), 1809–1817. PMID: 15509549.
- Hakumaki, J M, Poptani, H, Puumalainen, A M, Loimas, & Kauppinen, R A. 1998. Quantitative ¹H nuclear magnetic resonance diffusion spectroscopy of BT4C rat glioma during thymidine kinase-mediated gene therapy in vivo: identification of apoptotic response. *Cancer research*, **58**(17), 3791–3799. PMID: 9731486.
- Hamilton, Gavin, Patel, Nayna, Forton, Daniel M, Hajnal, Joseph V, & Taylor-Robinson, Simon D. 2003. Prior knowledge for time domain quantification of in vivo brain or liver ³¹P MR spectra. *NMR in biomedicine*, **16**(3), 168–176. PMID: 12884361.
- Harada, Masafumi, Uno, Masaaki, Hong, Fang, Hisaoka, Sonoka, Nishitani, Hiromu, & Matsuda, Tsuyoshi. 2002. Diffusion-weighted in vivo localized proton MR spectroscopy of human cerebral ischemia and tumor. *NMR in biomedicine*, **15**(1), 69–74. PMID: 11840555.
- Horowitz, S B. 1972. The permeability of the amphibian oocyte nucleus, in situ. *The Journal of cell biology*, **54**(3), 609–625. PMID: 4537884.
- Kan, Hermien E, Techawiboonwong, Aranee, van Osch, Matthias J P, Versluis, Maarten J, Deelchand, Dinesh K, Henry, Pierre-Gilles, Marjanska, Malgorzata, van Buchem, Mark A, Webb, Andrew G, & Ronen, Itamar. 2011. Differences in apparent diffusion coefficients of brain metabolites between grey and white matter in the human brain measured at 7 T. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, Nov. PMID: 22083562.
- Keith, A D, Snipes, W, Mehlhorn, R J, & Gunter, T. 1977. Factors restricting diffusion of water-soluble spin labels. *Biophysical journal*, **19**(3), 205–218. PMID: 890035.
- Klose, U. 1990. In vivo proton spectroscopy in presence of eddy currents. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **14**(1), 26–30. PMID: 2161984.

- Klunk, W.E., Xu, C., Panchalingram, K., McClure, R.J., & Pettegrew, J.W. 1996. Quantitative ¹H and ³¹P MRS of PCA extracts of postmortem Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Aging*, **17**(3), 349–357.
- Kreis, T E, Geiger, B, & Schlessinger, J. 1982. Mobility of microinjected rhodamine actin within living chicken gizzard cells determined by fluorescence photobleaching recovery. *Cell*, **29**(3), 835–845. PMID: 6891291.
- Kroenke, Christopher D, Ackerman, Joseph J H, & Yablonskiy, Dmitriy A. 2004. On the nature of the NAA diffusion attenuated MR signal in the central nervous system. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **52**(5), 1052–1059. PMID: 15508157.
- Lei, Hao, Zhu, Xiao-Hong, Zhang, Xiao-Liang, Ugurbil, Kamil, & Chen, Wei. 2003a. In vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy of human brain at 7 T: an initial experience. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **49**(2), 199–205. PMID: 12541238.
- Lei, Hao, Ugurbil, Kamil, & Chen, Wei. 2003b. Measurement of unidirectional Pi to ATP flux in human visual cortex at 7 T by using in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(24), 14409–14414. PMID: 14612566.
- Luby-Phelps, K. 2000. CYTOARCHITECTURE AND PHYSICAL PROPERTIES OF CYTOPLASM: VOLUME, VISCOSITY, DIFFUSION, INTRACELLULAR SURFACE AREA. *International review of cytology*, **192**, 189–221.
- Luo, Y, de Graaf, R A, DelaBarre, L, Tannús, A, & Garwood, M. 2001. BISTRO: an outer-volume suppression method that tolerates RF field inhomogeneity. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **45**(6), 1095–1102. PMID: 11378888.
- Malchus, Nina, & Weiss, Matthias. 2010. Elucidating anomalous protein diffusion in living cells with fluorescence correlation spectroscopy-facts and pitfalls. *Journal of fluorescence*, **20**(1), 19–26. PMID: 19582558.
- Mandal, Pravat K, Akolkar, Himanshu, & Tripathi, Manjari. 2012. Mapping of hippocampal pH and neurochemicals from in vivo multi-voxel ³¹P study in healthy normal young male/female, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, **31 Suppl 3**, S75–86. PMID: 22426021.
- Marjanska, Malgorzata, Curran, Geoffrey L, Wengenack, Thomas M, Henry, Pierre-Gilles, Bliss, Robin L, Poduslo, Joseph F, Jack, Clifford R, Jr, Ugurbil, Kâmil, & Garwood,

- Michael. 2005. Monitoring disease progression in transgenic mouse models of Alzheimer's disease with proton magnetic resonance spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(33), 11906–11910. PMID: 16091461.
- Mastro, A M, Babich, M A, Taylor, W D, & Keith, A D. 1984. Diffusion of a small molecule in the cytoplasm of mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**(11), 3414–3418. PMID: 6328515.
- McEwen, B S, & Grafstein, B. 1968. Fast and slow components in axonal transport of protein. *The Journal of cell biology*, **38**(3), 494–508. PMID: 5664220.
- Merboldt, K D, Hn, D, H, W, Bruhn, H, & Frahm, J. 1993. Molecular self-diffusion of intracellular metabolites in rat brain in vivo investigated by localized proton NMR diffusion spectroscopy. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **29**(1), 125–129. PMID: 8419733.
- Mori, S, & van Zijl, P C. 1995. Diffusion weighting by the trace of the diffusion tensor within a single scan. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **33**(1), 41–52. PMID: 7891534.
- Mosconi, Lisa. 2005. Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, **32**(4), 486–510. PMID: 15747152.
- Nicolay, K, van der Toorn, A, & Dijkhuizen, R M. 1995. In vivo diffusion spectroscopy. An overview. *NMR in biomedicine*, **8**(7-8), 365–374. PMID: 8739273.
- Nicolay, K, Braun, K P, Graaf, R A, Dijkhuizen, R M, & Kruiskamp, M J. 2001. Diffusion NMR spectroscopy. *NMR in biomedicine*, **14**(2), 94–111. PMID: 11320536.
- Nilsen, Linn H, Melo, Torun M, Saether, Oddbjorn, Witter, Menno P, & Sonnewald, Ursula. 2012. Altered neurochemical profile in the McGill-R-Thy1-APP rat model of Alzheimer's disease: a longitudinal in vivo 1 H MRS study. *Journal of neurochemistry*, **123**(4), 532–541. PMID: 22943908.
- Oberheim, Nancy Ann, Tian, Guo-Feng, Han, Xiaoning, Peng, Weiguo, Takano, Takahiro, Ransom, Bruce, & Nedergaard, Maiken. 2008. Loss of Astrocytic Domain Organization in the Epileptic Brain. *The Journal of Neuroscience*, **28**(13), 3264–3276.
- Ordidge, R.J, Connelly, A, & Lohman, J.A.B. 1986. Image-selected in Vivo spectroscopy (ISIS). A new technique for spatially selective nmr spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, **66**(2), 283–294.

- Perge, János A., Koch, Kristin, Miller, Robert, Sterling, Peter, & Balasubramanian, Vijay. 2009. How the Optic Nerve Allocates Space, Energy Capacity, and Information. *The Journal of Neuroscience*, **29**(24), 7917–7928.
- Pettegrew, J W, Klunk, W E, Panchalingam, K, McClure, R J, & Stanley, J A. 1997. Magnetic resonance spectroscopic changes in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **826**(Sept.), 282–306. PMID: 9329700.
- Pfeuffer, J, Tkac, I, & Gruetter, R. 2000. Extracellular-intracellular distribution of glucose and lactate in the rat brain assessed noninvasively by diffusion-weighted ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy in vivo. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **20**(4), 736–746. PMID: 10779018.
- Posse, S, Cuenod, C A, & Le Bihan, D. 1993. Human brain: proton diffusion MR spectroscopy. *Radiology*, **188**(3), 719–725. PMID: 8351339.
- Provencher, S W. 1993. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **30**(6), 672–679. PMID: 8139448.
- Rango, Mario, Bonifati, Cristiana, & Bresolin, Nereo. 2005. Parkinson's disease and brain mitochondrial dysfunction: a functional phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **26**(2), 283–290.
- Ronen, Itamar, Ercan, Ece, & Webb, Andrew. 2013. Axonal and glial microstructural information obtained with diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy at 7T. *Frontiers in integrative neuroscience*, **7**, 13. PMID: 23493316.
- Santacruz, K, Lewis, J, Spires, T, Paulson, J, Kotilinek, L, Ingelsson, M, Guimaraes, A, DeTure, M, Ramsden, M, McGowan, E, Forster, C, Yue, M, Orne, J, Janus, C, Mariash, A, Kuskowski, M, Hyman, B, Hutton, M, & Ashe, K H. 2005. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science (New York, N.Y.)*, **309**(5733), 476–481. PMID: 16020737.
- Santamaria, Fidel, Wils, Stefan, De Schutter, Erik, & Augustine, George J. 2006. Anomalous diffusion in Purkinje cell dendrites caused by spines. *Neuron*, **52**(4), 635–648. PMID: 17114048.
- Sherwin, R P, Richters, A, & Richters, V. 1967. The occurrence of a cyclosis-like phenomenon in human lung cancer cells in vitro. *Cancer research*, **27**(1), 152–158. PMID: 5335873.

- Stepisnik. 1993. Time-dependent self-diffusion by NMR spin-echo. *Physica B: Condensed Matter*, **183**(4), 343–350.
- Stepisnik, Janez, Mohori, & Duh, Andrej. 2001. Diffusion and flow in a porous structure by the gradient spin echo spectral analysis. *Physica B: Condensed Matter*, **307**(1-4), 158–168.
- Sun, Daniel, Lye-Barthel, Ming, Masland, Richard H, & Jakobs, Tatjana C. 2010. Structural remodeling of fibrous astrocytes after axonal injury. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **30**(42), 14008–14019. PMID: 20962222.
- Tkac, Ivan, Henry, Pierre-Gilles, Zacharoff, Lori, Wedel, Michael, Gong, Wuming, Deelchand, Dinesh K., Li, Tongbin, & Dubinsky, Janet M. 2012. Homeostatic adaptations in brain energy metabolism in mouse models of Huntington disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, July.
- Upadhyay, Jaymin, Hallock, Kevin, Erb, Kelley, Kim, Dae-Shik, & Ronen, Itamar. 2007. Diffusion properties of NAA in human corpus callosum as studied with diffusion tensor spectroscopy. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **58**(5), 1045–1053. PMID: 17969098.
- Valette, Julien, Guillermier, Martine, Besret, Laurent, Boumezbeur, Fawzi, Hantraye, Philippe, & Lebon, Vincent. 2005. Optimized diffusion-weighted spectroscopy for measuring brain glutamate apparent diffusion coefficient on a whole-body MR system. *NMR in Biomedicine*, **18**(8), 527–533. PMID: 16177956.
- Valette, Julien, Guillermier, Martine, Besret, Laurent, Hantraye, Philippe, Bloch, Gilles, & Lebon, Vincent. 2007. Isoflurane strongly affects the diffusion of intracellular metabolites, as shown by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of the monkey brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **27**(3), 588–596. PMID: 16788716.
- Valette, Julien, Chaumeil, Myriam, Guillermier, Martine, Bloch, Gilles, Hantraye, Philippe, & Lebon, Vincent. 2008. Diffusion-weighted NMR spectroscopy allows probing of ¹³C labeling of glutamate inside distinct metabolic compartments in the brain. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **60**(2), 306–311. PMID: 18666130.
- Valette, Julien, Lethimonnier, Franck, & Lebon, Vincent. 2010. About the origins of NMR diffusion-weighting induced by frequency-swept pulses. *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif.: 1997)*, **205**(2), 255–259. PMID: 20570538.

- Valette, Julien, Giraudeau, Céline, Marchadour, Charlotte, Djemai, Boucif, Geffroy, Françoise, Ghaly, Mohamed Ahmed, Le Bihan, Denis, Hantraye, Philippe, Lebon, Vincent, & Lethimonnier, Franck. 2012. A new sequence for single-shot diffusion-weighted NMR spectroscopy by the trace of the diffusion tensor. *Magnetic Resonance in Medicine*.
- van der Toorn, A, Dijkhuizen, R M, Tulleken, C A, & Nicolay, K. 1996. Diffusion of metabolites in normal and ischemic rat brain measured by localized ^1H MRS. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **36**(6), 914–922. PMID: 8946357.
- Vanhamme, van den Boogaart A, & S, Van Huffel. 1997. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif.: 1997)*, **129**(1), 35–43. PMID: 9405214.
- Wang, Samuel S.-H., & Augustine, George J. 1995. Confocal imaging and local photolysis of caged compounds: Dual probes of synaptic function. *Neuron*, **15**(4), 755–760.
- Wheatley, D N. 1998. Diffusion theory, the cell and the synapse. *Bio Systems*, **45**(2), 151–163. PMID: 9544405.
- Wheatley, D N. 1999. On the vital role of fluid movement in organisms and cells: a brief historical account from Harvey to Coulson, extending the hypothesis of circulation. *Medical Hypotheses*, **52**(4), 275–284. PMID: 10465662.
- Wick, M, Nagatomo, Y, Prielmeier, F, & Frahm, J. 1995. Alteration of intracellular metabolite diffusion in rat brain in vivo during ischemia and reperfusion. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, **26**(10), 1930–1933; discussion 1934. PMID: 7570750.
- Wood, Emily T, Ronen, Itamar, Techawiboonwong, Aranee, Jones, Craig K, Barker, Peter B, Calabresi, Peter, Harrison, Daniel, & Reich, Daniel S. 2012. Investigating axonal damage in multiple sclerosis by diffusion tensor spectroscopy. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **32**(19), 6665–6669. PMID: 22573688.
- Yang, Dwen, Xie, Zhiyong, Stephenson, Diane, Morton, Daniel, Hicks, Carol D, Brown, Tracy M, Sriram, Renuka, O'Neill, Sharon, Raunig, David, & Bocan, Thomas. 2011. Volumetric MRI and MRS provide sensitive measures of Alzheimer's disease neuropathology in inducible Tau transgenic mice (rTg4510). *NeuroImage*, **54**(4), 2652–2658. PMID: 21035554.
- Yi, Kexi, Unruh, Jay R., Deng, Manqi, Slaughter, Brian D., Rubinstein, Boris, & Li, Rong. 2011. Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3-complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes. *Nature Cell Biology*, **13**(10), 1252–1258.

- Zacharoff, Lori, Tkac, Ivan, Song, Qingfeng, Tang, Chuanning, Bolan, Patrick J, Mangia, Silvia, Henry, Pierre-Gilles, Li, Tongbin, & Dubinsky, Janet M. 2012. Cortical metabolites as biomarkers in the R6/2 model of Huntington's disease. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **32**(3), 502–514. PMID: 22044866.
- Zheng, D D, Liu, Z H, Fang, J, Wang, X Y, & Zhang, J. 2012. The effect of age and cerebral ischemia on diffusion-weighted proton MR spectroscopy of the human brain. *AJNR. American journal of neuroradiology*, **33**(3), 563–568. PMID: 22081680.

Sixième partie

Annexes

Démonstration des directions optimales de gradients

$$\mathbf{G} = \begin{pmatrix} x & z & y \\ y & x & z \\ z & y & x \end{pmatrix} \quad (\text{A.1})$$

On cherche à maximiser la norme des vecteurs constituant la matrice \mathbf{G} , ce qui revient à trouver le maximum de la fonction f .

$$f : (x, y, z) \longrightarrow \sqrt{x^2 + y^2 + z^2} \quad (\text{A.2})$$

De plus les vecteurs doivent être orthogonaux entre eux. Les coordonnées x, y, z vérifient la relation $xy + xz + yz = 0$. La fonction f se simplifie :

$$f : (x, y, z) \longrightarrow |x + y + z| \quad (\text{A.3})$$

De plus, en utilisant la même relation, on a $z = -\frac{xy}{x+y}$. Finalement, la fonction f à optimiser devient :

$$f : (x, y, z) \longrightarrow \left| x + y - \frac{xy}{x+y} \right| \quad (\text{A.4})$$

Avec x et y compris entre -1 et 1.

Pour étudier cette fonction, on définit 2 domaines représentés sur la figure [VI.A.1](#).

$$\text{Premier domaine} \begin{cases} -1 \leq y \leq \frac{x}{x-1} \\ -1 \leq x \leq 0.5 \end{cases} \quad (\text{A.5})$$

$$\text{Deuxième domaine} \begin{cases} -\frac{x}{x-1} \leq y \leq 1 \\ -0.5 \leq x \leq 1 \end{cases} \quad (\text{A.6})$$

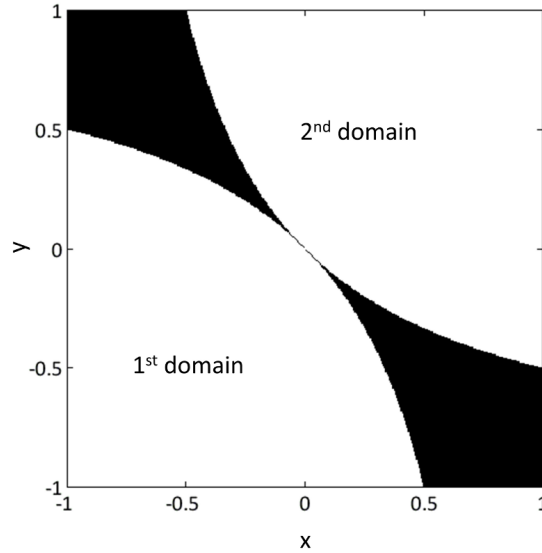


FIGURE VI.A.1 – Représentation des deux domaines sur lesquels se font l'optimisation des directions des gradients de diffusion.

Sur ces 2 domaines, on cherche les extrema de la fonction $f_x : y \longrightarrow x + y - \frac{xy}{x+y}$.

Sur le premier domaine, pour $x < 0$, f_x augmente sur l'intervalle $[-1;0]$ puis décroît sur $[0;x/(x-1)]$.

En $y = -1$, le minimum vaut $\frac{x^2-x+1}{x-1}$, fonction de x qui est comprise entre -1.5 et -1. En $y = 0$, le maximum vaut x qui est compris entre -1 et 0. En $y = x/(x-1)$, le second minimum vaut de nouveau $\frac{x^2-x+1}{x-1}$ qui est compris entre -1.5 et -1.

Si $x > 0$, f_x augmente sur l'intervalle $[-1;-2x]$ puis décroît sur $[-2x;x/(x-1)]$. Les minima restent les mêmes que pour $x < 0$ et sont donc compris entre -1.5 et -1. Le maximum est égal à $-3x$ qui est compris entre -1.5 et 0.

Finalement, le maximum de la norme de f_x est 1.5.

Une analyse similaire permet d'avoir le même résultat sur le deuxième domaine.

La norme optimale est obtenue pour $x = 1$, $y = 1$, $z = -0.5$.

Communications scientifiques

Articles

- Anomalous diffusion of brain metabolites evidenced by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy in vivo. **C. Marchadour**, V. Lebon, J. Valette. JCBFM, August 2012.
- A new sequence for single-shot diffusion-weighted NMR spectroscopy by the trace of the diffusion tensor. J. Valette, C. Giraudeau, **C. Marchadour**, B. Djemai, F. Geffroy, MA Ghaly, D. Le Bihan, P. Hantraye, V. Lebon, F. Lethimonnier. MRM, February 2012

Communications orales

- **19th Annual ISMRM Meeting, Montréal, Québec, Canada, 6-13 my 2011.**
Poster électronique : Towards the assessment of intracellular viscosity: diffusion spectroscopy at ultra short diffusion time in the rat brain. **C. Marchadour**, M. Guillermier, D. Houitte, M. Chaigneau, P. Hantraye, V. Lebon, J. Valette.
- **20th Annual ISMRM Meeting, Melbourne, Australia, 5-11 may 2012.**
Poster électronique : Transport mechanisms of intracellular metabolites in the brain: new insights by diffusion-weighted NMR spectroscopy with oscillating gradients. **C. Marchadour**, V. Lebon, J. Valette.
Oral : Optimized diffusion-weighted LASER sequence for single-shot measurement of metabolite diffusion by the trace of the tensor. **C. Marchadour**, V. Lebon, J. Valette.

Spectroscopie RMN cérébrale pour l'étude du milieu intracellulaire in vivo : développements méthodologiques pour la diffusion à courtes échelles de temps et pour la mesure du pH en détection ^{31}P

La spectroscopie RMN est un moyen unique d'évaluer l'environnement cellulaire in vivo. En effet, contrairement à l'eau, les molécules observées sont exclusivement intracellulaires, et ont en général un rôle biochimique ainsi qu'une compartimentation cellulaire spécifique. C'est donc un outil potentiellement utile pour comprendre le fonctionnement des cellules dans leur environnement. Mon travail de thèse consistait à développer de nouvelles séquences de spectroscopie dans deux domaines différents : 1) la spectroscopie de diffusion et 2) la spectroscopie du phosphore ^{31}P .

En spectroscopie RMN de diffusion, la mesure du coefficient de diffusion apparent (ADC) dépend de nombreux paramètres, la restriction, l'encombrement intracellulaire, la viscosité du cytoplasme et la présence ou non de transport actif. Le problème étant sous déterminé, l'interprétation des résultats est délicate. Il est en effet difficile de savoir quels paramètres influent majoritairement sur le mouvement des métabolites et donc sur la mesure de l'ADC. Mon premier travail a été de développer une séquence de spectroscopie de diffusion à temps de diffusion ultra-court pour tenter de répondre à cette question. Cette séquence a permis la première observation de la diffusion anormale dans le cerveau de rat, c'est-à-dire la dépendance de l'ADC au temps de diffusion. L'évolution de l'ADC en fonction du temps de diffusion montre que le transport des métabolites dans le cerveau se fait essentiellement par diffusion aléatoire et que la contribution des transports actifs (s'ils existent) est négligeable. De plus, la modélisation des données a mis en évidence que la spectroscopie de diffusion à court temps de diffusion était sensible à la viscosité du cytoplasme et à l'encombrement à courte échelle. Cette technique a donc été choisie lors d'une collaboration avec la firme Eli Lilly pour le suivi de souris transgéniques (rTg4510), modèle de taupathie. Dans ce modèle animal, l'hyperphosphorylation de la protéine tau conduit à l'apparition de lésions sous forme soluble (augmentation de la viscosité) ou sous forme d'agrégats (augmentation de l'encombrement). Le passage du rat à la souris étant critique d'un point de vue sensibilité, une nouvelle séquence de diffusion, maximisant la sensibilité tout en minimisant les biais, a été développée pour cette étude. Les résultats préliminaires font apparaître des différences significatives d'ADC pour la plupart des métabolites observés, entre 3 et 6 mois d'âge, c'est-à-dire à un stade précoce de la neurodégénérescence. La poursuite de l'étude est en cours. La spectroscopie RMN du phosphore ^{31}P permet d'observer des métabolites directement impliqués dans le processus énergétique (adénosine triphosphate, phosphocréatine, phosphate inorganique). Cependant, cette technique est assez difficile à mettre en œuvre du fait de la faible sensibilité du noyau et des temps de relaxation T_2 des métabolites très courts. Au cours de cette thèse, des séquences de localisation ont été développées pour pouvoir mesurer le pH intracellulaire dans le striatum de macaque, l'objectif étant de limiter les pertes de signal pendant la localisation. A terme, ces séquences seront utilisées pour évaluer l'utilité potentielle du pH comme biomarqueur de la neurodégénérescence dans un modèle phénotypique de la maladie de Huntington chez le macaque (intoxication chronique à l'acide 3 nitropropionique).

Mots clés : Spectroscopie de diffusion, neurodégénérescence